

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



MUDr. Michal Tomčík

**Význam nových prozánětlivých a/nebo profibrotických molekul
v patogenezi systémové sklerodermie**

*The role of new pro-inflammatory and/or pro-fibrotic molecules
in the pathogenesis of systemic sclerosis*

Disertační práce

Školitel:	Doc. MUDr. Radim Bečvář, CSc.
Odborný konzultant:	Doc. MUDr. Ladislav Šenolt, PhD.
Pracoviště:	Revmatologický ústav Klinika revmatologie 1.LF UK Na Slupi 4 128 50 Praha 2

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 23.09.2013

MUDr. Michal Tomčík

Identifikační záznam:

TOMČÍK, Michal. Význam nových prozánětlivých a/nebo profibrotických molekul v patogenezi systémové sklerodermie. (The role of new pro-inflammatory and/or pro-fibrotic molecules in the pathogenesis of systemic sclerosis). Praha, 2013. 91 s., 3 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Revmatologický ústav, Klinika revmatologie 1. LF UK. Školitel Bečvář, Radim. Odborný konzultant Šenolt, Ladislav.

Abstrakt

Úvod: Systémová sklerodermie (SSc) je generalizované onemocnění pojivové tkáně postihující kůži a vnitřní orgány. V patogenezi SSc se uplatňuje zánět, vaskulopatie a fibróza. Žádný z dosud zkoušených léků zatím neprokázal přesvědčivou účinnost v léčbě SSc. S100A4 se účastní regulace buněčné motility, proliferace, apoptózy, angiogeneze a remodelace extracelulární matrix. Původně byl popsán jako promotor metastazování u nádorů, avšak nedávno byly dokumentovány i jeho prozánětlivé vlastnosti u zánětlivých revmatických onemocnění. Cílem této práce bylo prozkoumat roli S100A4 při patologické aktivaci fibroblastů u SSc a v modelech experimentální kožní fibrózy.

Výsledky: Exprese S100A4 byla zvýšená v kůži pacientů se SSc, v SSc fibroblastech i v myších modelech experimentální kožní fibrózy způsobem závislým na TGF- β / Smad signální kaskádě. Zvýšení exprese S100A4 anebo stimulace pomocí rekombinantního S100A4 proteinu indukovali v klidových normálních fibroblastech aktivovaný fenotyp. Snížení exprese S100A4 nebo jeho kompletní deficit naopak utlumili profibrotické účinky TGF- β a potlačili tvorbu kolagenu. S100A4 knock-out myši (S100A4^{-/-}) byly uchráněny před rozvojem experimentální kožní fibrózy indukované bleomycinem a měly redukované ztlustění dermis, snížený obsah hydroxyprolinu a menší počet aktivovaných fibroblastů, tzv. myofibroblastů. Deficit S100A4 podobně utlumil rozvoj kožní fibrózy u Tight skin-1 (Tsk-1) myšího modelu. Antifibrotické účinky inaktivace S100A4 v obou experimentálních modelech kožní fibrózy byly zprostředkované inhibicí TGF- β / Smad signální kaskády.

Závěr: Naše výsledky ukazují, že S100A4 je pozitivním regulátorem stimulačních účinků TGF- β na fibroblasty u SSc. Exprese S100A4 je indukovaná pomocí TGF- β a S100A4 zpětně potencuje stimulační účinky TGF- β / Smad signální kaskády na tvorbu kolagenu SSc fibroblasty a indukci fibrózy. Jelikož je S100A4 důležitým mediátorem profibrotických účinků TGF- β a efekt protilátek neutralizujících S100A4 je momentálně zkoumán u nádorových onemocnění, mohl by se S100A4 protein stát kandidátní molekulou nové antifibrotické terapie.

Klíčová slova: S100A4, fibróza, sklerodermie, Smad3, fibroblasty

Abstract

Introduction: Systemic sclerosis (SSc) is a generalized connective tissue disease affecting the skin and internal organs. The pathogenesis of SSc is characterized by inflammation, vasculopathy and fibrosis. To date, none of the tested drugs have demonstrated convincing efficacy in the treatment of SSc. S100A4 is involved in the regulation of cell motility, proliferation, apoptosis, angiogenesis and remodeling of the extracellular matrix. It was originally described as a promoter of metastasis in tumors, however, its pro-inflammatory properties have recently been demonstrated in inflammatory rheumatic diseases. The aim of this study was to assess the role of S100A4 in pathological activation of fibroblasts in SSc and in experimental models of dermal fibrosis.

Results: The expression of S100A4 was increased in the skin of SSc patients, in SSc fibroblasts and in experimental fibrosis in a TGF- β / Smad dependent manner. Overexpression of S100A4 or stimulation with recombinant S100A4 induced an activated phenotype in resting normal fibroblasts. In contrast, inhibition of S100A4 or its complete deficit abrogated the pro-fibrotic effects of TGF- β and decreased the release of collagen. S100A4 knock-out mice (S100A4^{-/-}) were protected from bleomycin-induced skin fibrosis with reduced dermal thickening, decreased hydroxyproline content and lower counts of activated fibroblasts, so called myofibroblasts. Similarly, deficiency of S100A4 also ameliorated fibrosis in the Tight skin-1 (Tsk-1) mouse model. Anti-fibrotic effects of the inactivation of S100A4 in both experimental models of dermal fibrosis were mediated by inhibition of TGF- β / Smad signaling.

Conclusion: Our results characterize S100A4 as a positive regulator of the stimulatory effects of TGF- β on fibroblasts in SSc. S100A4 is induced by TGF- β and in turn amplifies the stimulatory effects of canonical TGF- β / Smad signaling on collagen synthesis by SSc fibroblasts and on induction of fibrosis. Since S100A4 is essentially required for the pro-fibrotic effects of TGF- β and neutralizing antibodies against S100A4 are currently evaluated in tumors, S100A4 might become a candidate molecule for novel anti-fibrotic therapies.

Key words: S100A4, fibrosis, scleroderma, Smad3, fibroblasts

OBSAH	Strana
1 ÚVOD	8
1.1 Systémová sklerodermie	8
1.1.1 Definice	8
1.1.2 Epidemiologie	8
1.1.3 Patogeneze	9
1.1.3.1 Poškození endotelu a vaskulopatie	9
1.1.3.2 Autoimunita a zánět	10
1.1.3.3 Fibróza	11
1.2 Zvířecí modely systémové sklerodermie	15
1.2.1 Bleomycinem indukovaná kožní fibróza	15
1.2.2 Chronická sklerodermatózní reakce štěpu proti hostiteli (SclGvHD)	16
1.2.3 Tight skin – 1 myši (Tsk-1)	16
1.2.4 UCD-200 a UCD-206 kuřata	17
1.2.5 Fra-2 transgenní myši	17
1.2.6 TBRI ^{CA} ; Cre-ER myši	18
1.3 S100A4 protein	18
1.3.1 Obecná charakteristika S100A4	18
1.3.2 Význam S100A4 u nádorových onemocnění	19
1.3.3 Význam S100A4 u nenádorových onemocnění	20
2 HYPOTÉZA A CÍLE	23
3 METODIKA	25
3.1 Pacienti, kožní biopsie a tkáňové kultury fibroblastů	25
3.2 Stimulace pomocí rekombinantního S100A4 a TGF- β	26
3.3 Klonování lidského genu pro S100A4	26
3.4 Zvýšení exprese S100A4 a utlumení exprese S100A4 a Smad3	27
3.5 Reporterové eseje	28
3.6 Izolace RNA a reverzní transkripce	28
3.7 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real time PCR)	29
3.8 Stanovení koncentrace kolagenu v supernatantu	29

3.9	Westernblot	30
3.10	Imunohistochemie a imunofluorescence	31
3.11	Model bleomycinem indukované kožní fibrózy	32
3.12	Model Tight skin-1 myši	32
3.13	Histologická analýza tloušťky kůže	34
3.14	Stanovení obsahu hydroxyprolinu v kůži	34
3.15	Stanovení počtu myofibroblastů v kůži	35
3.16	Statistická analýza	35
4	VÝSLEDKY	36
4.1	Exprese S100A4 je zvýšená u SSc	36
4.2	TGF- β indukuje expresi S100A4 v závislosti na Smad3	39
4.3	S100A4 indukuje aktivaci fibroblastů a syntézu kolagenu	42
4.4	Inhibice S100A4 tlumí stimulační účinky TGF- β na fibroblasty	47
4.5	S100A4 knock-out myši jsou chráněny před rozvojem kožní fibrózy indukované bleomycinem	52
4.6	Deficit S100A4 brání rozvoji fibrózy u Tsk-1 myši	56
5	DISKUSE	62
6	ZÁVĚR	65
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	70
9	SEZNAM PUBLIKACÍ	84
10	SEZNAM ABSTRAKT	87
11	PODĚKOVÁNÍ	90
12	PŘÍLOHY	91

1 ÚVOD

1.1 Systémová sklerodermie

1.1.1 Definice

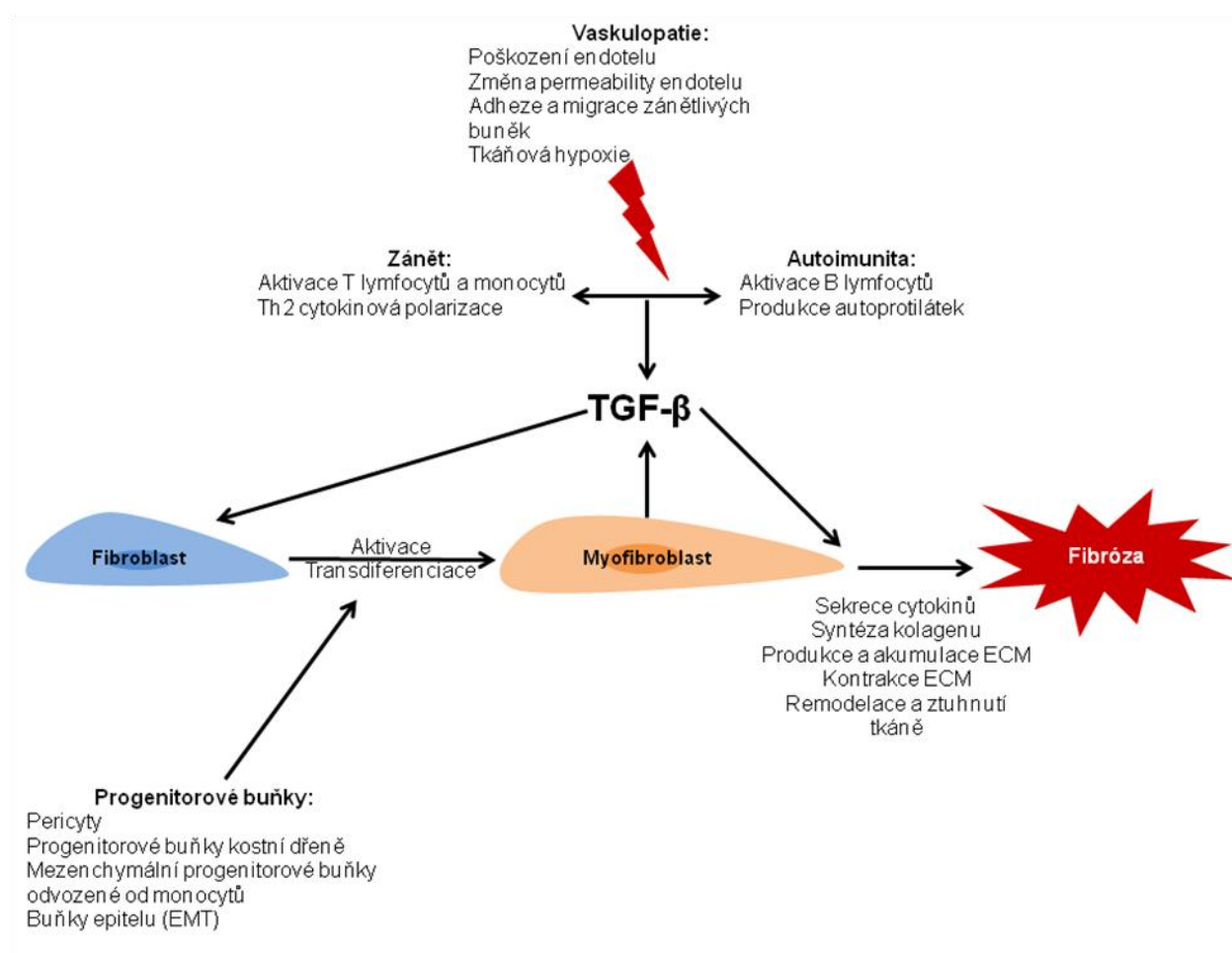
Systémová sklerodermie (SSc) je vzácné chronické potenciálně letální systémové onemocnění pojiva nejasné etiologie. Pro SSc je typická heterogenita multisystémových klinických manifestací a variabilní, nepředvídatelný průběh. Dochází k postižení kůže, srdce, tepen, plic, gastrointestinálního traktu, ledvin a sexuálních funkcí. Mezi hlavní patologické procesy v patogenezi SSc patří autoimunita a zánět, vaskulopatie postihující četná cévní lůžka a progresivní intersticiální a perivaskulární fibróza (Abraham D., Varga J., 2005). Všechny tři klíčové procesy jsou vzájemně propojeny, což odlišuje SSc od jiných systémových onemocnění pojiva a fibrotizujících onemocnění. Pacienty se SSc běžně klasifikujeme podle typu kožního postižení na dva základní podtypy - limitovanou (lcSSc, limited cutaneous SSc) a difúzní formu (dcSSc, diffuse cutaneous SSc). Pro difúzní formu je typická rapidní progresie fibrózy kůže, plic a dalších vnitřních orgánů, zatímco u limitované SSc dominují cévní manifestace a fibróza kůže a orgánů je obecně limitovaná a progreduje pomalu (LeRoy E., Medsger T., 2001). I když se kvalita života a délka přežití pacientů se SSc v posledních letech stále zlepšuje, hlavně díky lepší léčbě orgánových manifestací a komplikací, SSc pořád zůstává nevléčitelnou nemocí. Difúzní forma SSc sebou nese nejvyšší riziko úmrtí ze všech systémových onemocnění pojiva s délkou přežití 10 let v 55% (Mayes M. et al., 2003).

1.1.2 Epidemiologie

Distribuce SSc je celosvětová a častěji se vyskytuje u žen (až 6:1) a u černochoů. Prevalence této nemoci se pohybuje mezi 200 - 300 případů na milion obyvatel a incidence je kolem 20 nových případů na milion obyvatel na rok. Průměrný věk začátku prvních symptomů specifických pro SSc je kolem 45 let. I když je SSc dědičné onemocnění, nedědí se podle Mendelových pravidel. Konkordance u dvojčat je jen 5%, ale prevalence SSc v rodinách (1,6 %) je několikrát vyšší než v běžné populaci (0,02 - 0,03 %) a pozitivní rodinná anamnéza pořád zůstává nejsilnějším rizikovým faktorem pro rozvoj SSc (Arnett F. et al., 2001; Feghali-Bostwick C. et al., 2003). Etiologie této nemoci je dosud neznámá. Mezi potenciální spouštěcí agens SSc patří viry včetně lidského cytomegaloviru (CMV), léky, environmentální faktory a práce s organickými rozpouštědly, vinyl chloridem a oxidem křemičitým (Nietert P., Silver R., 2000).

1.1.3 Patogeneze

V patogenezi SSc dominují tři navzájem se prolínající patologické procesy – 1) poškození endotelu a obliterující vaskulopatie četných cévních lůžek, 2) zánět a autoimunita a 3) progresivní fibróza (obr. 1). Vaskulopatie a zánět předchází rozvoji fibrózy a fibróza s vaskulopatií následně udržují zánětlivou aktivitu a tím uzavírají bludný kruh (Varga J., Abraham D., 2007).



Obr. 1: Patogeneze systémové sklerodermie (Převzato z Varga J. et al., 2007)

TGF-β, transformující růstový faktor beta; ECM, extracelulární matrix; EMT, epiteliálně-mezenchymální tranzice.

1.1.3.1 Poškození endotelu a vaskulopatie

Vaskulární poškození je nejčasnějším a pravděpodobně i primárním procesem v patogenezi SSc a je histopatologicky prokazatelné před rozvojem fibrózy a objevením se prvního klinického příznaku, kterým obvykle bývá Raynaudův fenomén (Kahaleh M. et al., 1979). K dalším manifestacím vaskulopatie u SSc patří teleangiektázie, typické změny na kapilárách nehtového lůžka, plicní arteriální hypertenze, antrální vaskulární ektázie a renální krize s maligní hypertenzí. Pro pozdější fázi je charakteristický nedostatek funkčních malých tepen

v postižené kůži a orgánech. Endoteliální poškození může být způsobeno granzymy, specifickými protilátkami proti buňkám endotelu, vaskulotropními viry, zánětlivými cytokiny nebo kyslíkovými radikály uvolněnými v průběhu cyklů ischemie a reperfúze (Kahaleh M., 2004). Poškození buněk endotelu vede jak k jejich apoptóze, tak i aktivaci, ke změnám permeability endotelu a adhezi s následnou transmigrací leukocytů přes endotel. Mechanizmy vedoucí k apoptóze buněk endotelu nebyly ještě zcela objasněny a předpokládá se, že molekulární mimikry mezi virovými patogeny a lidskými autoantigeny spouštějí produkci anti-endoteliálních autoprotištětek, jenž vedou k apoptóze buněk endotelu (Lunardi C. et al., 2000). Aktivace endoteliálních buněk je provázána uvolňováním četných endoteliálních mediátorů, mezi které patří zejména endothelin-1 (ET-1). Vazokonstrikční, proliferativní a profibrotické účinky ET-1 vedou k hypertrofii cévní intimy, médie, fibróze adventicie a následně k progredujícímu zúžení lumen a obliteraci postižených cév (Abraham D., Distler O., 2007). Obliterace tepen vede společně s apoptózou buněk endotelu k výrazné redukci kapilární sítě, což je typické pro pozdější fázi SSc, závažnému nedostatku živin a hypoxii. Chronická hypoxie vede ke zvýšené produkci VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a angiogenezi, jenž je u SSc nedostatečná a projevuje se vznikem cévních malformací, obrovských, vakovitých a keříkovitých kapilár (Distler O. et al., 2004). Další snahou o korekci hypoxie je vaskulogeneze, tvorba nových cév *de novo* z progenitorů endoteliálních buněk z kostní dřeně, jejichž počet je u SSc rovněž redukován a vede k nedostatečné vaskulogenezi (Distler J. et al., 2009). Dalším faktorem, který tlumí angiogenezi u SSc, je porucha funkce pericytů, které následně brání migraci a proliferaci buněk endotelu a jsou odpovědné za perivaskulární depozici extracelulární matrix (ECM) a fibrózu (Varga J., Abraham D., 2007).

1.1.3.2 Autoimunita a zánět

V patogenezi SSc má význam jak vrozená tak získaná imunita. Poškození endotelu vede k adhezi a aktivaci leukocytů a jejich migraci přes endotel. V kožních lézích pacientů s recentním počátkem SSc lze histopatologicky prokázat perivaskulární infiltráty T a B lymfocytů, makrofágů a žírných buněk (Artlett C., 2005). T lymfocyty infiltrující postižené tkáně přispívají k rozvoji SSc sekrecí různých profibrotických cytokinů a chemokinů. Pro SSc je charakteristická nerovnováha v profilu exprese cytokinů s typickou preferenční sekrecí cytokinů Th2 (T helper) lymfocytů – IL (interleukin)-4 a IL-13, jenž podněcují proliferaci a migraci fibroblastů, stimulují je k produkci kolagenu a sekreci TGF- β (transformující růstový faktor beta) a CTGF (tkáňový pojivový růstový faktor) (Wynn T., 2004).

Na rozdíl od Th2 imunitní odpovědi je exprese Th1 antifibrotických cytokinů INF- γ (interferon- γ) a IL-10 u SSc redukována (Pannu J., Trojanowska M., 2004). I když je populace B lymfocytů v perivaskulárních infiltrátech u SSc menší, B buněční humorální imunitní odpověď má zásadní význam pro diagnostiku SSc a pravděpodobně i přispívá k progresi nemoci (Varga J., Abraham D., 2007). Anticentromerové (ACA) a anti-Scl-70 (protilátky proti topoizomeráze I) autoprotiilátky jsou silně asociovány s podtypem SSc (ACA s lcSSc a Scl-70 s dcSSc). Autoprotiilátky proti buňkám endotelu vedou k jejich apoptóze a aktivaci (Carvalho D. et al., 1996) a protilátky proti PDGF (růstový faktor z destiček) receptorům stimulují produkci ECM fibroblasty (Baroni S. et al., 2006). Produkce autoprotiilátek u pacientů se SSc zatím nebyla zcela objasněna a roli zde pravděpodobně hrají molekulární mimikry, zvýšená exprese nebo alterovaná subcelulární lokalizace potenciálních autoantigenních peptidů a chronická B buněčná hyperreaktivita způsobená abnormalitami B buněk (Harris M., Rosen A., 2003). Aktivované a dysfunkční B lymfocyty však nepřispívají k patogenezi SSc jen produkcí autoprotiilátek. Uvolňují také IL-6, jenž stimuluje fibroblasty a podporuje rozvoj fibrózy u SSc (Varga J., Abraham D., 2007).

1.1.3.3 Fibróza

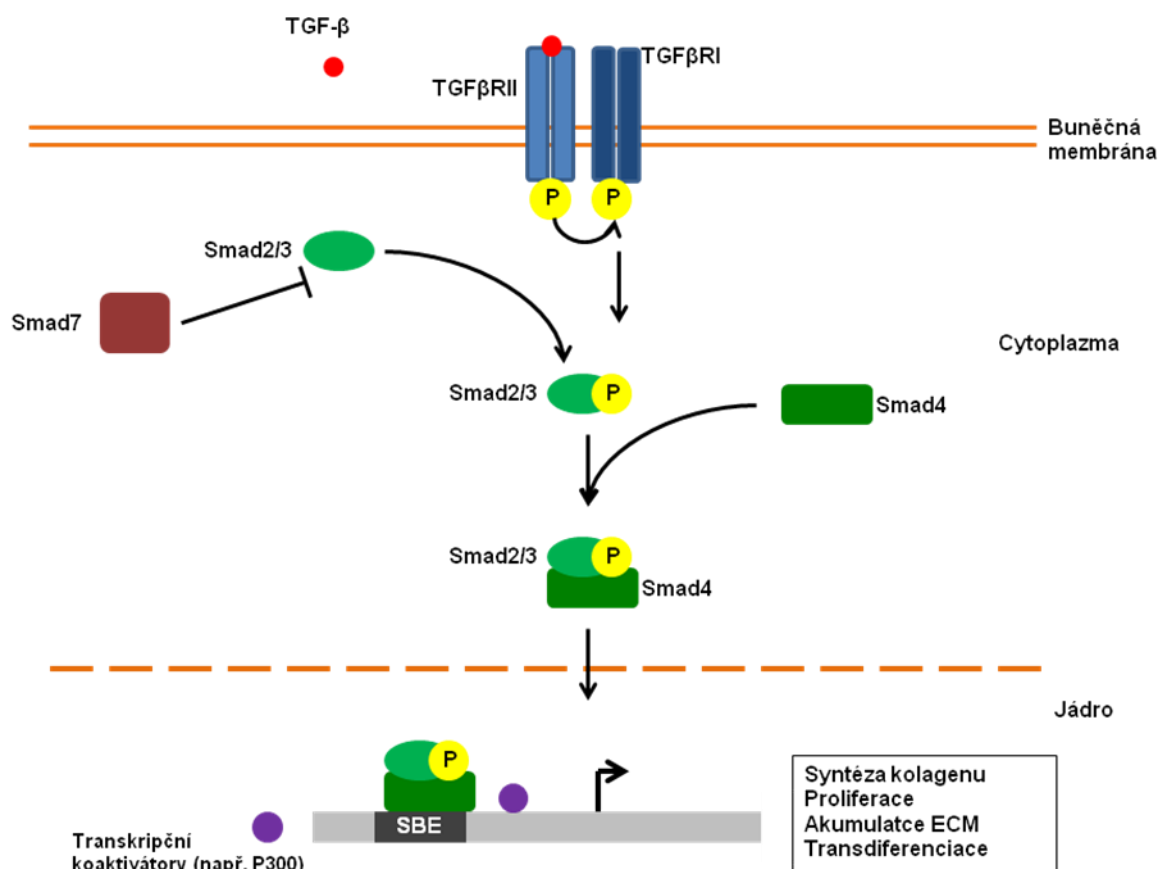
Fibróza bývá často dominantním rysem SSc a postihuje jak kůži, tak vnitřní orgány - zejména plíce, srdce a gastrointestinální trakt. Dochází k postupnému nahrazení funkční tkáně postižených orgánů kolagenními vlákny a dalšími složkami ECM, což vede ke ztrátě jejich funkce a selhávání. Ke zvýšené produkci ECM dochází za fyziologických podmínek při hojení ran. Na rozdíl od tohoto sebelimitujícího procesu dochází v hypertrofické jizevnaté tkáni a v lézích pacientů se SSc k perzistentní zesílené fibrogenезi s nadbytečnou perivaskulární a intersticiální akumulací ECM. ECM je komplexní směs proteinů uspořádaných do organizované struktury, mezi které patří hlavně kolageny, proteoglykany, fibriliny, fibronectin, malé proteoglykany bohaté na leucin a adhezní molekuly (Varga J., Abraham D., 2007).

Fibroblasty jsou hlavním efektozem fibrogenезe. Fibroblasty izolované z postižené kůže nebo plic pacientů se SSc mají abnormální, aktivovaný fenotyp, který je signál-independentní a přetrvává po několik pasáží *in vitro* (LeRoy E., 1974). Pro aktivovaný fenotyp je typická nadměrná produkce složek ECM, konstitutivní sekrece cytokinů a chemokinů a zvýšená exprese membránových receptorů vážících profibrotické mediátory (Pannu J., Trojanowska M., 2004). SSc fibroblasty jsou rovněž relativně rezistentní vůči apoptóze a je u nich zvýšena

exprese faktorů s antiapoptotickým účinkem Bcl2 (B-cell lymphoma 2) a Akt (PKB, proteinkináza B). U SSc fibroblastů také častěji dochází k transdiferenciaci v myofibroblasty (aktivované fibroblasty) obsahující α -smooth muscle actin (α -SMA) – centrální komponentu cytoplazmatického kontraktilního aparátu buněk podobných hladkému svalu. Za fyziologických podmínek hrají myofibroblasty hlavní roli v procesu hojení ran prostřednictvím její kontrakce, syntézy kolagenů a dalších složek EMC a sekrece profibrotických mediátorů. Zdrojem pro myofibroblasty jsou kromě rezidentních intersticiálních fibroblastů podléhajících procesu transdiferenciace také pericyty, progenitory z kostní dřeně a buňky epitelu, které podléhají za patologických podmínek, jakými jsou tumorigeneze a renální a plicní fibróza, epiteliálně-mezenchymální tranzici (obr. 1) (Varga J., Abraham D., 2007). Většiny charakteristik aktivovaných SSc fibroblastů lze dosáhnout pomocí stimulace TGF- β . Zvýšená exprese receptorů pro TGF- β na povrchu SSc fibroblastů a alterovaný poměr receptorů I. a II. typu vede k robustní odpovědi na TGF- β podnět (Pannu J., Trojanowska M., 2004). K dosažení kompletního fenotypu SSc fibroblastů však samotné TGF- β nestačí a předpokládá se účast epigenetických modifikací, alterace signálních cest integrinů z prostředí okolní ECM a mezibuněčné kontakty s dalšími buněčnými typy včetně destiček, buněk zánětlivého infiltrátu, endotelu a epitelu (Varga J., Abraham D., 2007).

Mezi hlavní mediátory fibrózy u SSc patří TGF- β , jenž je produkován jako latentní komplex četnými buňkami včetně destiček, monocytů/makrofágů, T lymfocytů a fibroblastů. Proces aktivace TGF- β je regulován interakcí s fibrilinem a dalšími složkami ECM včetně integrinů, trombospondinů, THY-1 (CD 90, Cluster of Differentiation 90) a plasminu. V buňkách mezenchymu podporuje TGF- β syntézu kolagenu, proliferaci, migraci, adhezi a transdiferenciaci buněk v myofibroblasty (Varga J., Abraham D., 2007). Po navázání aktivního TGF- β na TGF- β receptor II. typu (TGF β RII) dochází k heterodimerizaci a aktivaci transmembránové serin-treoninové kinázy TGF- β receptoru I. typu (TGF β RI). Ten následně aktivuje klasickou Smad-dependentní TGF- β signální transdukcí (obr. 2) i Smad-nedependentní signální cesty (obr. 3) zahrnující MAP (mitogen-activated protein) kinázy p38 a JNK (c-Jun N-terminal kinase), PI3K (phosphoinositol-3-kinase), tyrosinovou kinázu c-Abl (cytoplasm-Abelson tyrosine kinase) a ROCK-1 (Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1). Mezi cílové geny Smad-dependentní signální kaskády patří kolagen typu I, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1 (PAI-1), α -SMA, CTGF a Smad7. U SSc fibroblastů byla prokázána deregulace procesů aktivace a inhibice Smad proteinů (Massague J., Gomis R., 2006; Pannu J., Trojanowska M., 2004; Varga J., Bashey R., 1995).

Mezi další mediátory fibrogenese u SSc patří CTGF a PDGF. CTGF je členem rodiny Cyr61/CTGF/NOV (CCN) matricelulárních růstových faktorů, které spojují buněčný povrch s ECM, kontrolují mezibuněčná spojení a migraci buněk, modulují aktivitu TGF- β a dalších cytokinů a regulují buněčnou diferenciaci, proliferaci, apoptózu a syntézu ECM (Leask A., Abraham D., 2006). TGF- β a ET-1 indukují expresi CTGF a ten je rovněž efektozem TGF- β v stimulaci produkce ECM (Krieg T. et al., 2007).



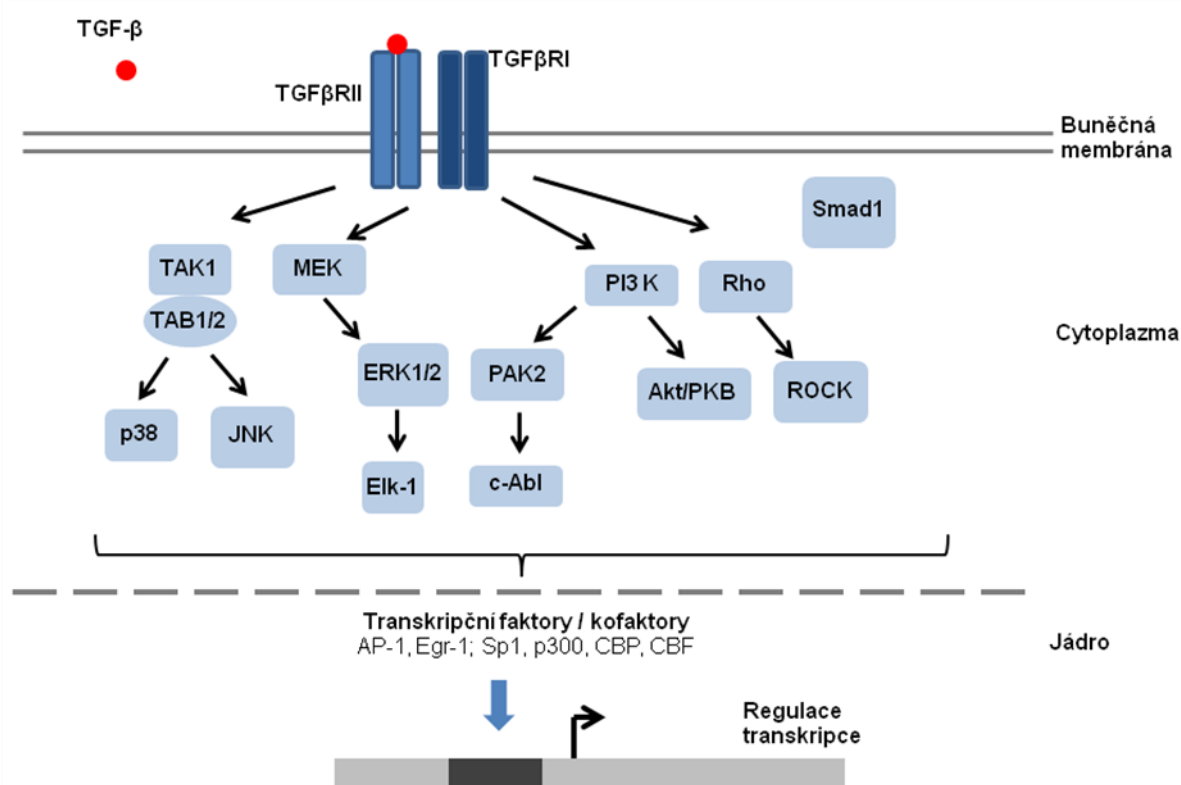
Obr. 2: Smad-dependentní TGF- β signální kaskáda (Převzato z Varga J. et al., 2008).

Po navázání aktivního TGF- β na TGF- β receptor II. typu dochází k heterodimerizaci a aktivaci transmembránové serin-treoninové kinázy TGF- β receptoru I. typu, která fosforyluje v cytoplasmě přítomné proteiny Smad2 a Smad3. Ty tvoří komplex se Smad4, který je translokován do jádra fibroblastu, váže se na Smad Binding Element-sekvenci DNA a společně s transkripčními faktory a kofaktory (např. P300) reguluje expresi cílových genů (hlavně komponent ECM).

TGF- β , transforming growth factor beta; TGF- β RII, transforming growth factor beta type II receptor; TGF- β RI, transforming growth factor beta type I receptor; SBE, Smad Binding Element; p300, E1A binding protein p300; ECM, extracelulární matrix

Dalším mediátorem fibrózy u SSc je PDGF. PDGF je potentním mitogenem a chemoatraktantem fibroblastů, nepřímo indukce produkci kolagenu, fibronektinu a proteoglykanů a zvyšuje sekreci profibrotických cytokinů TGF- β , MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) a IL-6 (Varga J., Abraham D., 2007). PDGF je uvolňován

aktivovanými destičkami, makrofágy a buňkami endotelu, jejichž alterované funkce a počet přispívají ke zvýšené expresi PDGF ve tkáních SSc pacientů. Dalším aktivátorem PDGF jsou stimulační autoprotilátky proti PDGF receptorům, které přes aktivaci intracelulární kaskády Ha-Ras-ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) a produkci kyslíkových radikálů vedou k aktivaci fibroblastů. Tento mechanismus je důkazem propojení procesů autoimunity a fibrózy v patogenezi SSc, které společně s vaskulopatií vedou k rozvoji a progresi této nemoci (Baroni S. et al., 2006).



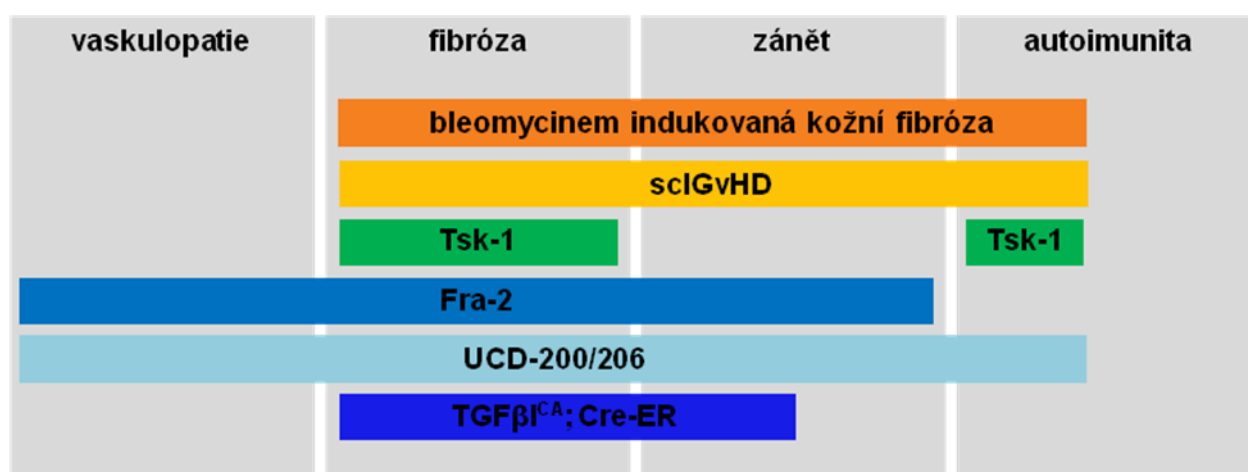
Obr. 3: Smad-nedependentní TGF-β signální kaskáda (Převzato z Varga J. et al., 2008)

Po navázání aktivního TGF-β na TGF-β receptor II. typu dochází k heterodimerizaci a aktivaci transmembránové serin-treoninové kinázy TGF-β receptoru I. typu, která fosforyluje v cytoplazmě přítomné četné kaskády kináz, které společně s transkripčními faktory a kofaktory regulují expresi cílových genů (hlavně složek ECM) v jádře fibroblastu. Tyto signální cesty mohou interagovat se Smad-dependentní signální kaskádou i působit zcela nezávisle.

TGF-β, transforming growth factor beta; TGF-βRII, transforming growth factor beta type II receptor; TGF-βRI, transforming growth factor beta type I receptor; TAK1, TGF-β activated kinase 1; TAB1/2, TAK1-binding protein 1/2; p38, p38 a JNK (c-Jun N-terminal kinase) jsou MAPKs (mitogen-activated protein kinases); MEK, mitogen-activated protein kinase kinase; ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinases; Elk-1, E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinases; PAK2, p21-activated kinase 2; c-Abl, cytoplasm-Abelson tyrosine kinase; Akt/PKB, protein kinase B; ROCK, Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1; AP-1, activator protein 1; EGR-1, early growth response 1; SP1, specificity protein 1; p300, E1A binding protein p300; CBP, CREB-binding protein; CBF, Core binding factor

1.2 Zvířecí modely systémové sklerodermie

Komplexní vztahy mezi třema klíčovými procesy v patogenezi SSc – aktivací imunitního systému, vaskulopatií a fibrózou – ještě nebyly zcela objasněny. Pro jejich lepší porozumění a studium potenciálních terapeutických agens, jenž ovlivňují široké spektrum patologických procesů u SSc, se v bazálním výzkumu používá několik etablovaných zvířecích modelů. Každý z nich napodobuje jen určité aspekty SSc (obr. 4) a zatím neexistuje ideální model, který by zahrnoval všechny procesy lidské SSc. Každý model má odlišné vlastnosti, výhody a limitace a jeho volba pro analýzu cílových genů musí být pečlivě zvážena (Beyer C. et al., 2010). Tato část úvodu se vzhledem k cílům této postgraduální práce zaměřuje jen na zvířecí modely s manifestací systémové nemoci s důrazem na experimentální kožní fibrózu, i když se běžně používají i modely orgánově specifické, jako například modely plicní fibrózy a plicní arteriální hypertenze.



Obr. 4: Přehled nejpoužívanějších zvířecích modelů SSc a zastoupení patogenetických procesů charakteristických pro SSc. (Převzato z Beyer C. et al., 2010)

sclGvHD, Chronická sklerodermatózní reakce štěpu proti hostiteli; Tsk-1, Tight skin-1 myši; Fra-2, Fra-2 transgenní myši; UCD-200/206; kuřata linie UCD-200 a UCD-206; TBRI^{CA}; Cre-ER, TBRI^{CA}; Cre-ER myši

1.2.1 Bleomycinem indukovaná kožní fibróza

Tento model je široce používaným *in vivo* modelem napodobujícím zánětlivé změny přítomné v časně fázi SSc. Bleomycin byl původně izolován ze *Streptomyces verticillus* a používá se v léčbě různých typů nádorů (Umezawa H. et al., 1967). Vysoké dávky bleomycinu mají však vedlejší účinky – vyvolávají plicní postižení a fibrózu a dokonce i kožní změny podobné SSc. Proto se bleomycin používá v myších modelech jak plicní tak kožní fibrózy. Opakované subkutánní injekce v definované oblasti po dobu 4 týdnů vedou k dermální fibróze, která přetrvává i 6 týdnů po jejich ukončení (Yamamoto T. et al., 1999). Kromě zánětlivého infiltrátu a rozvoje fibrózy v postižené kůži dochází rovněž k mírnému postižení plic a fibróze

a jsou také přítomny antinukleární protilátky (ANA), anti-Scl-70, anti-U1 RNP a antihistonové protilátky, což svědčí i pro systémové postižení u tohoto modelu (Yoshizaki A. et al., 2008). Bleomycin indukuje v kůži produkci kyslíkových radikálů, vede k postižení buněk endotelu a jiných buněčných typů a k expresi adhezních molekul. Ta má za následek zvýšenou infiltraci postižené kůže leukocyty, T i B lymfocyty, makrofágy, eozinofily a žírnými buňkami. Zánětlivý infiltrát uvolňuje zvýšené množství profibrotických a prozánětlivých cytokinů (TGF- β , PDGF, MCP 1, IL-4, IL-6 a IL-13), které aktivují rezidentní fibroblasty a ty produkují nadměrné množství složek ECM vedoucí ke kožní fibróze (Yamamoto T., Nishioka K., 2005).

1.2.2 Chronická sklerodermatózní reakce štěpu proti hostiteli (SclGvHD)

Chronická reakce štěpu proti hostiteli (GvHD, graft-versus-host-disease) se vyskytuje u 40 – 60 % dlouhodobě přežívajících pacientů po transplantaci hematopoetických buněk. Sklerodermatózní a cytotoxický typ jsou dvě hlavní formy chronické GvHD (Vogelsang G. et al., 2003). SclGvHD je fibrotizujícím typem a jeho klinické příznaky jsou podobné s manifestacemi časně zánětlivé fáze difúzní formy SSc. Indukce SclGvHD u myši se provádí standardním způsobem (hematopoetické buňky jsou transplantovány subletálně ozářeným BALB/c myším) nebo modifikovaným způsobem [hematopoetické buňky jsou transplantovány imunodeficientním RAG-2 (recombinase activating gen-2) myším] (Ruzek M. et al., 2004). V obou případech se jedná o transplantaci hematopoetických buněk dárce příjemci s identickým MHC (hlavní histokompatibilní komplex), ale nestejnými vedlejšími histokompatibilními antigeny, což po rekonstituci hematopoézy indukuje u příjemce SclGvHD se zánětem a fibrózou kůže, plic, jater, ledvin, gastrointestinálního traktu a příušních žláz. Kromě zánětu a fibrózy je zde rovněž přítomna produkce autoprotilátek proti nukleárním antigenům. V patogenezi chronické SclGvHD hrají klíčovou roli aloreaktivní CD4 T lymfocyty (Claman H. et al., 1985; Howell C. et al., 1989; Jaffee B., Claman H., 1983; Levy S. et al., 2000; Li J. et al., 1996).

1.2.3 Tight skin – 1 myši (Tsk-1)

Jedná se o autozomálně dominantní mutaci – tandemovou duplikaci v genu pro fibrillin 1, který je důležitým regulátorem TGF- β signální kaskády a fibrogenese. Tato mutace vede u heterozygotních myši (značeny Tsk-1) k hyperplázii a ztuhnutí podkoží a produkci autoprotilátek (anti-Scl-70, anti-RNA-polymeráza I, anti-dsDNA). Dominantní homozygoti zemřou již v průběhu gestace (Baxter R. et al., 2005; Green M. et al., 1976; Menton D., Hess

R., 1980; Menton D. et al., 1978; Siracusa L. et al., 1996). Fibróza u těchto myší vzniká na podkladě nadměrné produkce ECM aktivovanými fibroblasty při aktivaci TGF- β signální kaskády. Přesný mechanismus však dosud nebyl objasněn. Na progresi fibrózy u Tsk-1 myší se podílí zvýšená exprese CD19, chronická aktivace B lymfocytů vedoucí ke zvýšené sekreci IL-6 a žírné buňky. Tyto mechanismy se uplatňují i u progresu lidské SSc. Tsk-1 myší se běžně používají jako model napodobující pozdější nezánettlivou fázi SSc (Saito E. et al., 2002).

1.2.4 UCD-200 a UCD-206 kuřata

Linie UCD-200 byla původně izolována na Kalifornské Univerzitě z Leghornských kuřat, u kterých byly pozorovány atrofické abnormality hřebene. Tato linie má systémové manifestace podobné příznakům u lidské SSc (Gershwin M. et al., 1981). Kožní postižení hřebene, krku a zad se projevuje jako otok, změny podobné Raynaudovu fenoménu, ztráta adnex a ztuhnutí kůže vedoucí k nekróze. U 20 % kuřat se vyskytují ischemické léze prstů. Dochází rovněž k postižení vnitřních orgánů zejména jícnu, srdce, plic a ledvin a zvýšené mortalitě (Gershwin M. et al., 1981; Wick G. et al., 2006). Histopatologické změny jsou podobné těm u lidské SSc a zahrnují mohutný perivaskulární mononukleární infiltrát a depozice složek ECM aktivovanými fibroblasty, známky obliterativní vaskulopatie a apoptózy endoteliálních buněk se ztrátou funkčních kapilár (Gershwin M. et al., 1981). UCD-200 kuřata také produkují autoprotilátky - zejména antinukleární, anti-centromérové, anti-fosfolipidové, revmatoidní faktor a protilátky proti buňkám endotelu (Sgonc R. et al., 1996; Wick G. et al., 2006). Kuřata linie UCD-206 jsou podobná kuřatům linie UCD-200, ale může se u nich vyvinout ještě závažnější orgánové postižení. Chov obou linií je velice náročný a finančně nákladný (Sgonc R., Wick G., 2008).

1.2.5 Fra-2 transgenní myši

Fra-2 je členem rodiny transkripčních faktorů zvaných AP1 (activator protein 1), které regulují buněčnou proliferaci, zánět a hojení ran (Wagner E., Eferl R., 2005). Zvýšená exprese Fra-2 byla popsána také u lidské SSc, konkrétně v myofibroblastech, endoteliálních buňkách a buňkách hladkého svalu, což svědčí pro potenciální význam Fra-2 v patogenezi lidské SSc (Maurer B. et al., 2009; Reich N. et al., 2010). Zvýšená exprese Fra-2 u myší vede k rozvoji systémového zánětu a fibrózy, hlavně v kůži a plicích. Pro Fra-2 transgenní myši je rovněž typický vaskulární fenotyp charakterizovaný zvýšenou apoptózou buněk endotelu a následnou závažnou ztrátou funkčních malých tepen kůže a plic. Histologické změny proliferativní

vaskulopatie v plicích myši se podobají plicní arteriální hypertenzi u SSc. Plicní fibróza a plicní arteriální hypertenze pak vedou k plicní insuficienci a zvýšené mortalitě myši (Eferl R. et al., 2008; Maurer B. et al., 2009; Reich N. et al., 2010).

1.2.6 TBRI^{CA}; Cre-ER myši

Pro účely výzkumu různých genů *in vivo* v prostředí se zvýšeně aktivovanou TGF- β signální kaskádou, jakožto centrálního profibrotického cytokinu v patogenezi SSc, byl vyvinut myši model se zvýšenou expresí konstitutivně aktivního TGF- β receptoru prvního typu (TGF β RI) ve fibroblastech. Specifické exprese jen ve fibroblastech bylo docíleno pomocí transkripčního enhanceru z genu pro kolagen pro α 2(I), který řídí expresi jen u fibroblastů a u žádných jiných buněčných typů (Bou-Gharios G. et al., 1996; Denton C. et al., 2001; Sonnylal S. et al., 2007). Pokus o vytvoření TGF β RI transgenních myši však nebyl úspěšný a myši zemřely již během gestace. Proto byl vyvinut model postnatální podmíněně zvýšené exprese TGF β RI pomocí tamoxifenem indukovatelného Cre/loxP systému (Sonnylal S. et al., 2007), jenž vede k progresivní generalizované dermální fibróze s nadprodukcí kolagenu I. a III. typu a atrofii adnex. Je zde přítomné i ztlustění stěny cév malých tepen plic, ledvin a nadledvin a také plicnice. Technická a ekonomická náročnost tohoto modelu vedla k zavedení alternativního řešení, kde je lokální kožní fibrózy dosaženo pomocí subkutánních injekcí s oslabeným adenovirem se zvýšenou expresí TGF β RI, která již ale není omezena jen na fibroblasty (Sonnylal S. et al., 2007).

1.3 S100A4 protein

1.3.1 Obecná charakteristika S100A4

S100A4 (metastasin, calvasculin, pEL, p9Ka, FspI, CAPL) je termolabilní protein o molekulové hmotnosti přibližně 12-kDa, který byl původně izolován u myši jako protein tvořený metastatickými buňkami adenokarcinomu mléčné žlázy (Ebraldze A. et al., 1989). Je to jeden z nejvíce studovaných členů rodiny S100 proteinů, které byly identifikovány a popsány v hovězím mozku a své pojmenování získaly na základě rozpustnosti ve 100 % roztoku amonium sulfátu při neutrálním pH (Moore B., 1965). Charakteristickým znakem S100 proteinů jsou dva strukturální motivy, tzv. „EF - vazebné domény“, které s různou afinitou váží kalcium (Isobe T., Okuyama T., 1978). Vazba kalcia vede ke strukturálním změnám umožňujícím navázání cílové molekuly a regulaci různých biologických procesů jak

v intracelulárním, tak extracelulárním prostředí (Santamaria-Kisiel L. et al., 2006). V podmínkách intracelulárního prostředí jsou S100 proteiny přítomny hlavně ve formě homodimerů a heterodimerů, zatímco v podmínkách extracelulárního prostředí se vyskytují spíše jako oligomery nebo multimery (Strupat K. et al., 2000). V intracelulárním prostředí se podílí na regulaci řady buněčných procesů, např. buněčné proliferace, apoptózy, motility a remodelace ECM (Donato R., 2003). S100 proteiny uvolněné do extracelulárního prostředí mají vlastnosti podobné cytokinům. Některé z nich se účastní regulace buněčných dějů prostřednictvím receptoru RAGE (receptor for advanced glycation end-products) (Huttunen H. et al., 2000), avšak v poslední době jsou předmětem výzkumu i další receptory asociované s S100 proteiny (Robinson M. et al., 2002).

S100A4 protein je u myši exprimován buňkami hladkých svalů, epitelu a endotelu, hnědou tukovou tkání, buňkami jater, parietálními buňkami žaludku, neurony a některými imunitními buňkami ve slezině, thymu a kostní dřeni (Gibbs F. et al., 1995; Grigorian M. et al., 1994). Z buněčných elementů regulujících zánět je S100A4 tvořen makrofágy, dendritickými buňkami, žírnými buňkami, neutrofily, určitými typy T lymfocytů, pericyty a také synoviálními fibroblasty ve stádiu chronického zánětu (Klingelhofer J. et al., 2007). Funkční S100A4 protein může tvořit homodimery (S100A4/S100A4), heterodimery (S100A4/S100A1) anebo oligomery či multimery (Tarabykina S. et al., 2000; Wang G. et al., 2000). S100A4 postrádá vlastní enzymatickou aktivitu a váže se na cílové proteiny. Intracelulární S100A4 se váže například na nesvalový myosin II (Kriajevska M. et al., 1994) a liprin β 1 (Kriajevska M. et al., 2002) hrající důležitou roli v buněčné adhezi a motilitě, a na tumor supresorový protein p53 regulující apoptózu (Kriajevska M. et al., 1994; Takenaga K. et al., 1994). Extracelulární S100A4 reguluje proces angiogeneze (Ambartsumian N. et al., 2001), produkci proteolytických enzymů remodelujících ECM (Senolt L. et al., 2006), stimuluje růst neuritu primárních hipokampálních neuronů (Novitskaya V. et al., 2000) a migraci astrocytárních nádorových buněk (Belot N. et al., 2002).

1.3.2 Význam S100A4 u nádorových onemocnění

Ukázalo se, že původní jméno, které bylo proteinu S100A4 uděleno v jedné z laboratoří, která se zabývala jeho výzkumem – metastatin 1 (mts1) – bylo velmi výstižné (Ebrilidze A. et al., 1989). Četné imunohistochemické studie exprese S100A4 přesvědčivě prokázaly její zvýšení u různých nádorových onemocnění a přímou souvislost s frekvencí tvorby metastáz a zvýšenou mortalitou pacientů. Příkladem jsou výsledky jedné studie na 349 pacientech

s rakovinou prsu, dle které přežilo v průběhu 19 let sledování až 80 % pacientů s nádorem neexprimujícím S100A4 na rozdíl od 11 % pacientů s nádorem exprimujícím tento protein (Platt-Higgins A. et al., 2000; Rudland P. et al., 2000). Asociace mezi expresí proteinu S100A4 a rozvojem metastáz byla prokázána například u nemalobuněčného nádoru plic (Kimura K. et al., 2000), rakoviny prostaty (Saleem M. et al., 2005), močového měchýře (Davies B. et al., 2002), ductálního adenokarcinomu pankreatu (Rosty C. et al., 2002), rakoviny žaludku (Yonemura Y. et al., 2000) a u některých typů melanomu (Andersen K. et al., 2004). S100A4 byl také popsán jako nezávislý prognostický marker u kolorektálního karcinomu (Boye K. et al., 2010). Podobné asociace mezi expresí S100A4 a rozvojem metastáz byly popsány i u myši. Subkutánní injekce myších nádorových buněk adenokarcinomu prsní žlázy (CSML-100), které vedou k rozvoji primárního nádoru a produkci plicních metastáz u 100 % S100A4 wild-type myši (s normální expresí S100A4), vedla u S100A4 knock-out myši (s deficitem S100A4) k rozvoji primárního tumoru jen v 45 % a k tvorbě metastáz nedošlo u žádné S100A4 knock-out myši (Grum-Schwensen B. et al., 2005). Naopak samotná zvýšená exprese S100A4 u S100A4 transgenních myši však neindukuje tvorbu nádorů (Ambartsumian N. et al., 1996). Mezi mechanismy metastatické progresie indukované proteinem S100A4 patří regulace buněčné motility, invaze, adheze, angiogeneze, buněčné smrti a epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) (Boye K., Maelandsmo G., 2010). S100A4 reguluje buněčnou motilitu interakcí s těžkým řetězcem nesvalového myosinu, což vede ke změnám dynamiky myosinu (Kriaevska M. et al., 1998) a s nesvalovým tropomyosinem a to má za následek rozklad aktinových filament (Takenaga K. et al., 1994). S100A4 také interaguje s řadou adhezivních molekul jako např. laminin, E-cadherin (Keirsebilck A. et al., 1998; Kimura K. et al., 2000) a liprin β 1 (Kriaevska M. et al., 2002). Regulace buněčného cyklu nádorových buněk proteinem S100A4 je zprostředkována jeho interakcí s tumor supresorovým genem p53 (Parker C. et al., 1994). Angiogeneze je ovlivňována S100A4 proteinem prostřednictvím regulace exprese trombospondinu 1 (Roberts D., 1996) a enzymů degradujících matrix, např. matrixmetaloproteináz (Grigorian M. et al., 2001).

1.3.3 Význam S100A4 u nenádorových onemocnění

Velký počet publikací je zaměřených na roli S100A4 v progresi nádorového bujení a tvorby metastáz. V posledních letech se objevuje mnoho prací, které dávají S100A4 do souvislosti s četnými nenádorovými onemocněními, např. fibróza plic, jater, retroperitonea a ledvin, hypertrofie a fibróza myokardu, regenerace poškozených neuronů a rohovky, psoriáza i

zánětlivá revmatická onemocnění jako revmatoidní artritida a idiopatické zánětlivé myopatie. Společným jmenovatelem většiny zmíněných onemocnění jsou fibrotické a zánětlivé procesy, tj. procesy závislé na remodelaci tkání, buněčné motilitě a epiteliálně-mezenchymální transzici (Schneider M. et al., 2008).

S100A4 byl popsán jako mediátor renální fibrózy. V postižené tkáni narůstá s fibrózou počet buněk exprimujících S100A4, částečně procesem EMT z tubulárního epitelu, a naopak jejich počet klesá při ústupu renálního selhání indukovaném pomocí BMP7 (bone morphogenetic protein 7). Počet S100A4 pozitivních buněk v renálních biopsiích také koreluje s renálním selháním u IgA nefropatie (Bruneval P. et al., 2005; Zeisberg M. et al., 2003).

V modelu jaterní fibrózy indukované CCl_4 dochází procesem EMT z hepatocytů ke zvýšení počtu buněk exprimujících S100A4. Podobně u primární biliární cirhózy narůstá počet S100A4 pozitivních buněk prostřednictvím EMT z epitelu žlučových. Zde byla rovněž popsána role S100A4 jako časného markeru primární biliární cirhózy (Robertson H. et al., 2007; Zeisberg M. et al., 2007).

Význam S100A4 proteinu jako mediátoru fibrózy byl popsán i v plicích. Zde hraje také roli v regulaci remodelace arterií indukované hypoxií. S100A4 je potenciálním markerem idiopatické plicní fibrózy a potencuje motilitu a proliferaci hladkých svalových buněk, neointimální hyperplázii a muskularizaci plicních tepen (Greenway S. et al., 2004; Lawson W. et al., 2005).

S100A4 je také mediátorem fibrózy v myším modelu srdeční fibrózy a stimulatorem růstu a regenerace u poškozené srdeční tkáně. Zvýšená exprese S100A4 prostřednictvím EMT je indukovatelná pomocí $\text{TGF-}\beta$ a k její opětovné regresi dochází působením BMP7. S100A4 potencuje růst srdečních myocytů, jejich přežívání a diferenciaci *in vitro* a má pravděpodobně kardioprotektivní účinky *in vivo*. U lidí byla prokázána zvýšená exprese S100A4 při infarktu myokardu nebo hemodynamicky významné stenóze koronárních tepen a rejekci srdečního transplantátu (Inamoto S. et al., 2000; Schneider M. et al., 2007; Zeisberg E. et al., 2007).

Zvýšená exprese S100A4 byla také prokázána v poškozené tkáni CNS a PNS. S100A4 podporuje růst a přežívání kultivovaných neuronů, má neuroprotektivní účinky po poranění nervové tkáně a reguluje motilitu astrocytů (Kozlova E., Lukanidin E., 1999; Kozlova E.,

Lukanidin E., 2002).

S100A4 byl rovněž popsán jako mediátor regenerace rohovky. Diferenciace keratocytů v myofibroblasty podmíněná TGF- β je spojená se současnou translokací S100A4 do jádra. Implantace S100A4 mikropoletů do rohovky navíc indukuje neoangiogenezi (Ryan D. et al., 2003).

V patogenezi revmatoidní artritidy podněcuje S100A4 patologickou remodelaci artritických kloubů a zvyšuje expresi a uvolňování matrixmetaloproteináz kultivovanými synoviálními fibroblasty a chondrocyty. S100A4 je zvýšeně produkován v místě zánětu synoviálními fibroblasty, zánětlivými buňkami i chondrocyty. Navíc byla prokázána jeho zvýšená exprese jak v synoviální tkáni a synoviální tekutině, tak i v plazmě pacientů s revmatoidní artritidou (Klingelhofer J. et al., 2007; Senolt L. et al., 2006).

Zvýšená exprese S100A4 byla také prokázána v zánětem postižené svalové tkáni pacientů s idiopatickými zánětlivými myopatiemi. V patogenezi zánětlivých myopatií působí S100A4 pravděpodobně jako faktor podobný cytokinům, který podporuje postižení svalových vláken prostřednictvím stimulace produkce prozánětlivých cytokinů mononukleárními buňkami (Cerezo L. et al., 2011).

2 HYPOTÉZA A CÍLE

Význam S100A4 proteinu byl v posledních 20 letech extenzivně studován u nádorových onemocnění, kde hraje dominantní roli v progresi nádorového bujení a ve tvorbě a šíření metastáz. V posledních letech se hromadí také důkazy o jeho významu u četných nenádorových onemocnění jako mediátoru fibrózy a zánětu. U idiopatických zánětlivých myopatií a revmatoidní artritidy byly popsány jeho prozánětlivé vlastnosti; navíc se předpokládá jeho stimulační role v patologické remodelaci artritického kloubu. Hypotéza této práce vychází z recentních poznatků o roli S100A4 u několika fibrotických stavů nebo jejich zvířecích modelů. Jako mediátor fibrózy byl S100A4 popsán v procesech renální, jaterní, plicní a retroperitoneální fibrózy, kardiální hypertrofie a dále jako stimulátor růstu a regenerace porušených nervů a regenerace rohovky. Úspěšné ověření hypotézy podporuje fakt, že systémová sklerodermie je chronické systémové onemocnění pojiva, v jehož patogenезi se uplatňuje zánět, vaskulární postižení i tkáňová fibróza. S100A4 protein dosud nebyl zkoumán u SSc a jeho role v patogenезi této nemoci není dosud známá.

Cílem této disertační práce bylo prozkoumat roli S100A4 v patogenезi SSc, hlavně v aktivaci fibroblastů produkujících nadbytečné množství složek extracelulární matrix vedoucí ke tkáňové fibróze, ztrátě funkce a orgánovému selhání a zhodnotit antifibrotické účinky inaktivace S100A4 na myších modelech experimentální kožní fibrózy.

Specifické cíle práce:

1. Analýza exprese S100A4 v postižené kůži a dermálních fibroblastech izolovaných z postižené kůže pacientů se SSc ve srovnání se zdravými kontrolami, zhodnocení struktur odpovědných za expresi S100A4 a regulace TGF- β signální kaskády.
2. Hodnocení efektu endogenního i exogenního zvýšení exprese S100A4 na zdravé dermální fibroblasty s ohledem na produkci kolagenu a regulaci TGF- β signální kaskády.
3. Zjištění efektu utlumení genové exprese S100A4 v dermálních fibroblastech na produkci kolagenu a ovlivnění TGF- β signální kaskády.

4. Analýza účinků inaktivace S100A4 pomocí S100A4 knock-out myší u modelu experimentální kožní fibrózy indukované bleomycinem, který napodobuje časnou – zánětlivou fázi SSc, a zhodnocení regulace TGF- β signální kaskády.
5. Zhodnocení účinků inaktivace S100A4 pomocí S100A4 knock-out myší u modelu experimentální kožní fibrózy u Tight skin-1 myší (Tsk-1), který napodobuje pozdější – nezápětlivou fibrotickou fázi SSc, a zhodnocení regulace TGF- β signální kaskády.

3 METODIKA

3.1 Pacienti, kožní biopsie a tkáňové kultury fibroblastů

Pro účely tkáňových kultur (I), imunohistochemických preparátů kůže (II) a pro izolaci RNA z kůže (III) byly odebrány bioptické vzorky z postižené kůže pacientů se SSc (n = 20) a zdravých kontrol (n = 18) se srovnatelným věkem a pohlavím. Všichni pacienti splnili kritéria pro SSc podle ACR (American College of Rheumatology) (LeRoy E., Medsger T., 2001). Základní charakteristiky pacientů se SSc a zdravých dárců jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1	pacienti se SSc	zdravé kontroly
pohlaví (ženy/muži)	16/4	14/4
věk (medián(rozsah))	51 let (33 - 79)	52 let (30 – 80)
trvání nemoci (medián(rozsah))	5 let (0.5 – 11)	-
dcSSc/lcSSc	20/0	-
pozitivita ANA	18/20 (90%)	-
pozitivita anti-Scl70	14/20 (70%)	-
Raynaudův fenomén	19/20 (95%)	-
postižení GIT	17/20 (85%)	-
artralgie a/nebo artritidy	13/20 (65%)	-
plicní fibróza	10/20 (50%)	-
plicní arteriální hypertenze	3/20 (15%)	-
postižení srdce	2/20 (10%)	-
postižení ledvin	1/20 (5%)	-
digitální ulcerace	6/20 (30%)	-
medikace v čase provedení biopsie	žádné DMARDs, GK či NSA	-

Tab. 1: Klinické charakteristiky pacientů se SSc a zdravých kontrol v čase provedení kožní biopsie

Všichni pacienti měli difúzní formu SSc (dcSSc). Forma SSc byla stanovena podle kritérií navržených podle LeRoy a spol. (LeRoy E., Medsger T., 2001). Délka trvání nemoci byla měřena od nástupu prvních symptomů jiných než Raynaudův fenomén, které patří do spektra příznaků SSc. Orgánová postižení byla diagnostikována podle doporučení EUSTAR (Kowal-Bielecka O. et al., 2009).

SSc, systémová sklerodermie; dcSSc, difúzní forma SSc; lcSSc, limitovaná forma SSc; ANA, antinukleární protilátky; anti-Scl70, protilátky proti topoisomeráze I; GIT, gastrointestinální trakt; DMARDs, disease modifying antirheumatic drugs (chorobu modifikující léky); GK, glukokortikoidy; NSA, nesteroidní antirevmatika; EULAR/EUSTAR, The European League Against Rheumatism/EULAR Scleroderma Trials and Research group

Po lokální anestezii pomocí 2 % mesocainu subkutánně byly odebrány tři vzorky kůže (I, II, III) pomocí bioptického průbojníku (biopsy punch o průměru 3 mm) a uskladněny dočasně do níže popsaného média pro kultivaci fibroblastů ohřátého na teplotu 37 °C (I), nebo do 4% PFA (paraformaldehyd) po dobu 6 h pro účely fixace a následné přípravy imunohistochemických preparátů (II) a do roztoku RNAlater (Invitrogen, Karlsruhe, Německo) pro stabilizaci a uchování RNA k následné izolaci RNA z kůže (III). (I) Po enzymatickém trávení mechanicky rozmělněného bioptického vzorku kůže pomocí Dispázy II (Boehringer Mannheim, Rotkreuz, Švýcarsko) byly fibroblasty kultivovány v Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) obsahujícím 10 % teplem inaktivované fetální hovězí sérum (FBS, fetal bovine serum), 100 U/ml penicillinu, 100 µg/ml streptomycinu, 2 mM L-glutaminu a 2,5 µg/ml amphotericinu B (všechny od Invitrogen) při teplotě 37 °C a v atmosféře 5 % CO₂ a vlhkosti vzduchu 90 %. Konfluentní buňky byly pasážovány pomocí trypsinizace po dobu 5 min při teplotě 37 °C. Fibroblasty z pasáží 4 – 8 byly následně použity pro *in vitro* experimenty. Všichni pacienti se SSc a zdraví dárci předem podepsali informovaný souhlas schválený místní etickou komisí.

3.2 Stimulace pomocí rekombinantního S100A4 a TGF-β

Pro stimulační experimenty byly fibroblasty kultivovány v DMEM/F12 obsahujícím 0,1 % FBS a kyselinu askorbovou (50 µg/ml) po dobu 3 dnů před stimulací příslušným cytokinem. Pro určitou sadu experimentů byly fibroblasty inkubované s rekombinantním TGF-β (10 ng/ml) (PeproTech, Hamburg, Německo) nebo rekombinantním S100A4 proteinem v různých koncentracích (0,01; 0,1; 1 a 10 µg/ml) (R&D Systems, Abingdon, Velká Británie). Použitá koncentrace TGF-β reprezentuje standardní koncentraci používanou pro stimulaci dermálních fibroblastů a je založena na sérových koncentracích TGF-β u pacientů se SSc (Distler J. et al., 2007; Jungel A. et al., 2007). Koncentrace S100A4 proteinu byly zvoleny na základě naměřených koncentrací S100A4 v sérech a v synoviální tekutině u pacientů s revmatoidní artritidou, u kontrolních pacientů s osteoartrózou a u zdravých kontrol (Klingelhofer J. et al., 2007). Po 24 h stimulaci byly buňky lyzovány v lyzačním pufru (obsahujícím 1 % β-merkaptóetanol v RA1 pufru (Macherey-Nagel, Dueren, Německo)) a kulturační médium bylo uchováno. Vzorky byly až do použití skladovány při teplotě -80 °C.

3.3 Klonování lidského genu pro S100A4

Gen pro S100A4 byl amplifikován z lidské cDNA (získané pomocí reverzní transkripce z RNA izolované z krve zdravých jedinců) pomocí PCR s použitím dvou oligonukleotidů (5'-

GATCGGATCCATGGCGTGCCCTCTGGAGAAGG -3' a

5'- GATCCTCGAGTCATTTCTTCCTGGGCTGCTTATCTGGG -3') komplementárních k aminotermínálnímu a karboxytermínálnímu kódujícímu úseku lidského genu pro S100A4. Tyto oligonukleotidy byly syntetizovány tak, aby obsahovaly restrikční místa pro enzymy BamHI a XhoI (podtržené sekvence – GGATCC pro BamHI a CTCGAG pro XhoI). Produkty polymerázové řetězové reakce (PCR) byly elektroforeticky očištěny, natráveny pomocí restrikčních enzymů BamHI a XhoI (New England Biolabs, Frankfurt, Německo) a ligovány do expresního vektoru pcDNA3.1(+) (Life Technologies, Darmstadt, Německo), který byl předem natráven stejnými restrikčními enzymy. Sekvence DNA klonovaného genu pro S100A4 pak byly komerčně analyzovány, aby se potvrdila jejich identita, integrita a nepřítomnost mutací začleněných do klonovaného genu prostřednictvím PCR. Rekombinantní plasmidy byly vneseny do *Escherichia coli* Dh5α (Novagen, Darmstadt, Germany) elektrokompetentních buněk a vyočkovány na tuhé (agarové) selekční půdy obsahující 50 µg/ml ampicilinu. Jednotlivé kolonie byly vyočkovány a testovány pomocí PCR, zda obsahují cílový produkt. Pozitivně testované kolonie byly pak naočkovány do LB (Luria Broth) média obsahujícího ampicilin, kultivovány přes noc při otáčkách 350 rpm a teplotě 37 °C. Buňky byly separovány pomocí centrifugace při otáčkách 2500 x g po dobu 5 min a plasmidy byly izolovány pomocí izolačního kitu (Promega, Madison, USA). S100A4 expresní plasmid (pcDNA3.1_S100A4) anebo kontrolní plasmid pcDNA3.1 byly pak transfekovány do fibroblastů s použitím 4D-Nucleofector (Lonza, Cologne, Německo). Účinnost transfekce byla potvrzena pomocí ko-transfekce s pSv-β-galaktosidázovými vektory (Promega).

3.4 Zvýšení exprese S100A4 a utlumení exprese S100A4 a Smad3

Pro experimenty určené ke zkoumání funkčních důsledků zvýšené exprese S100A4 bylo transfekováno 5 µg S00A4 expresního plasmidu do dermálních fibroblastů s použitím 4D-Nucleofector (Lonza). Transfekce s prázdným pcDNA3.1 plasmidem sloužila jako kontrola.

Pro experimenty určené ke zkoumání funkčních důsledků snížené exprese S100A4 nebo Smad3 byly transfekovány 3 µg předem navržených siRNA (small interfering RNA) duplexů proti S100A4 nebo Smad3 (oba od Thermo Scientific, Bonn, Německo) do fibroblastů pomocí Nucleofector Kit (Amixa GmbH, Cologne, Německo) s použitím přístroje 4D-Nucleofector (Lonza). Transfekce s kontrolní siRNA sloužila jako kontrola. Sekvence použitých siRNA proti S100A4 a Smad3 jsou uvedeny v tab. 2.

primer	sekvence (5'→3')
S100A4 siRNA sense	UGUGUAACGAAUUCUUUGA
S100A4 siRNA antisense	UCAAAGAAUUCGUUACACA
ON-TARGETplus Human	CAACAGGAAUGCAGCAGUG
Smad3 siRNAs SMARTpool	GAGUUCGCCUUCAAUAUGA
	GGACGCAGGUUCUCCAAAC
	UUAGAGACAUCAAGUAUGG

Tab. 2: Sekvence použitých siRNA

3.5 Reporterové eseje

Pro experimenty určené ke zkoumání funkčních důsledků zvýšené exprese S100A4 (pomocí S100A4 expresního plasmidu) anebo snížené exprese S100A4 (pomocí S100A4 siRNA) prostřednictvím analýzy aktivace promotoru genu pro kolagen 1a2 byl pomocí Lipofectamine 2000 (Invitrogen) transfekován do fibroblastů -353 col1a2-Luc konstrukt anebo kontrolní běžný pSv-β-galaktozidázový vektor (β-gal). -353 col1a2-Luc konstrukt obsahuje fragment genu pro col1a2 mezi nukleotidy -353 a +58.

Pro experimenty určené ke zkoumání funkčních důsledků zvýšené či snížené exprese S100A4 (pomocí S100A4 expresního plasmidu anebo pomocí S100A4 siRNA) byla zvolena i analýza aktivace SBE (Smad Binding Element), který se nachází v promotorech genů přímo indukovatelných pomocí TGF-β / Smad signální kaskády (Massague J., Gomis R., 2006; Pannu J., Trojanowska M., 2004; Varga J., Bashey R., 1995). Pro tyto účely byl do fibroblastů transdukován adenovirový vektor nesoucí sekvenci CAGA charakteristickou pro SBE (Ad-CAGA-Luc konstrukt) s 1000:1 MOI (multiplicita infekce). Jako kontrola transdukční účinnosti sloužil Ad-LacZ konstrukt. Luciferázová aktivita u obou reporterových esejí byla stanovena pomocí mikrodestičkového luminometru (Berthold Technologies, Bad Herrenalb, Německo).

3.6 Izolace RNA a reverzní transkripce

Myši nebo lidská kůže byla homogenizována v lyzačním pufru (1 % β-merkaptetanol v RA1 pufru (Macherey-Nagel)) pomocí Precellys Keramik Kit s použitím homogenizátoru Precellys 24 homogenizer (oba od Peqlab, Erlangen, Německo). Celková buněčná RNA byla izolována pomocí komerčního kitu NucleoSpin® RNA II Total RNA Isolation Kit (Macherey-Nagel) podle návodu výrobce. Pro získání komplementární DNA (cDNA) byla buněčná RNA

reverzně přepsána pomocí reverzní transkriptázy, náhodných hexamerů (random hexamers), dNTP mixu (deoxyribonukleotidtrifosfát), inhibitoru Rnázy, 10x TaqMan RT Buffer a 25 nM MgCl₂ (všechny od Applied Biosystems, Darmstadt, Německo). Reakce reverzní transkripce byla provedena v celkovém objemu 10 µl s použitím termocykleru Biometra Tpersonal thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Německo) 10 min při teplotě 20 °C , následně 30 min při 48 °C a 5 min při 95 °C.

3.7 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (real time PCR)

Expres vybraných genů byla kvantifikovaná pomocí SYBR Green real time-PCR s použitím detekčního systému Stratagene Mx 3005P detection system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). SYBRGreen metoda je založena na fluorescenčním interkalačním kyaninovém barvivu SYBRGreen, které fluoreskuje po vazbě na menší žlábek dsDNA a jehož fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR produktu. Rozdíly v expresi genů byly kvantifikovány pomocí hodnot Ct (cycle threshold, tj. počet cyklů potřebných pro fluorescenční signál na překonání práhu pro hodnoty pozadí). Pro relativní kvantifikaci byla použita komparativní Ct metoda. Pro stanovení hodnot ΔC_t byly analyzované geny normalizované vůči „housekeeping“ genu β -actin, který sloužil jako endogenní kontrola. Genomická kontaminace a formace dimerů z primerů byla vyloučena pomocí „non-RT kontrol“ (vzorky cDNA, které byly reverzně transkribovány bez použití reverzní transkriptázy), „no template kontrol“ (vzorků bez cDNA) a analýzou disociační křivky. Seznam sekvencí použitých primerů pro analýzu genové exprese je uveden v tab. 3.

3.8 Stanovení koncentrace kolagenu v supernatantu

Celkový rozpustný kolagen v supernatantech buněčných kultur byl kvantifikován pomocí SirCol kolagenové eseje (Biocolor, Belfast, Severní Irsko). 400 µl červeného barviva Sirius Red, které se specificky váže s bázeckými řetězci kolagenu za podmínek stanovených touto esejí, bylo inkubováno se 150 µl supernatantu při mírném promíchávání po dobu 30 min při pokojové teplotě. Po následné 10 min centrifugaci při otáčkách 12000 x g byl komplex kolagenu a barviva rozpuštěn v 400 µl 0,5 M NaOH. Absorbance, která je přímo úměrná množství nově tvořeného kolagenu ve vzorku, pak byla stanovena při vlnové délce 540 nm pomocí mikrodestičkového spektrofotometru Spectra MAX 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

primer	sekvence (5' → 3')
humánní β -actin fwd	AGAAAATCTGGCACCACACC
humánní β -actin rev	TAGCACAGCCTGGATAGC
humánní S100A4 fwd	GATGAGCAACTTGGACAGCA
humánní S100A4 rev	ACTCTTGGAAGTCCACCTCGT
humánní colla1 fwd	TCAAGAGAAGGCTCACGATGG
humánní colla1 rev	TCACGGTCACGAACCACATT
humánní colla2 fwd	GGTCAGCACCAACCGATGTC
humánní colla2 rev	CACGCCTGCCCTTCCTT
humánní PAI-1 fwd	TCATTGCTGCCCCTTATGA
humánní PAI-1 rev	GTTGGTGAGGGCAGAGAGAG
humánní Smad7 fwd	TACTCCAGATACCCGATGGATT
humánní Smad7 rev	TCTGGACAGTCTGCAGTTGG
myší β -actin fwd	TCTTTGATGTACGCACGAT
myší β -actin rev	TACAGCTTCACCACCACA
myší S100A4 fwd	TGCATTCCAGAAGGTGATGA
myší S100A4 rev	CTTCATTGTCCCTGTTGCTGT
myší colla1 fwd	GAAGCACGTCTGGTTTGA
myší colla1 rev	ACTCGAACGGGAATCCATC
myší colla2 fwd	CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGA
myší colla2 rev	TCAAACCTGGCTGCCACCAT
myší PAI-1 fwd	ACGTTGTGGAAGTCCCCTAC
myší PAI-1 rev	AGCGATGAACATGCTGAGG
myší Smad7 fwd	GCTCAATTCCGACAACAAGAG
myší Smad7 rev	TCTTGCTCCGCACTTTCTG

Tab. 3: Sekvence použitých humánních a myších primerů pro real time PCR

3.9 Westernblot

Pro analýzu lyzátu celých buněk byly nejdříve konfluentní fibroblasty tripsynizovány a posléze centrifugovány při otáčkách 400 x g po dobu 5 min. Pelet lyzátu buněk byl pak resuspendován v 1x Laemliho pufru. Koncentrace proteinu byla stanovena pomocí amidočerně B 10 (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Německo) s použitím 96-jamkového filtračního systému Multiscreen HTS™-DV 96-well Filtration System (0,65 μ m, Millipore, Schwalbach, Německo) podle protokolu SERVA ProtaQuant Assay Kit (Serva, Heidelberg, Německo) za účelem normalizace množství nanášeného proteinu. 10 μ g proteinu z každého zkoumaného vzorku bylo separováno pomocí 12,5 % SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza) a přeneseno na PVDF membránu

(polyvinylidendifluorid) (Roth, Karlsruhe, Německo) podle standardních protokolů. Po blokování nespecifické vazby pomocí 2 % BSA (hovězí sérový albumin) v PBS (Phosphate buffered saline) (Invitrogen) po dobu 60 min byly membrány inkubovány s monoklonálními králičími anti-S100A4 protilátkami (1:1000, laskavý dar od M. Grigorian, Institute of Cancer Biology, Kodaň, Dánsko) (Zibert J. et al., 2010) přes noc při teplotě 4 °C. Protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (HRP-, horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies) (1:200, Dako, Glostrup, Dánsko) byly použity jako sekundární protilátky. Proteiny byly vizualizovány pomocí detekčního systému ECL plus Western Blotting Detection System a následně vystaveny vysoce výkonnému chemiluminiscenčnímu filmu (oba od Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Velká Británie). Stejně nanesené množství proteinu ve stanovovaných vzorcích bylo potvrzeno pomocí vizualizace „housekeeping“ proteinu, β -actin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo).

3.10 Imunohistochemie a imunofluorescence

Vzorky kůže (získané jak z biopsie kůže pacientů se SSc a zdravých kontrol tak i z kůže myši) byly po fixaci ve 4 % PFA (paraformaldehyd) po dobu 6 h při pokojové teplotě zality do parafínu a nařezány zkušenou technickou laborantkou pomocí rotačního mikrotomu na jednotnou tloušťku 5 μ m podle standardních protokolů přípravy imunohistochemických preparátů. Parafínové řezy byly deparafinizovány, rehydratovány a endogenní peroxidázová aktivita byla inhibována 3 % roztokem H_2O_2 po dobu 30 min. Kultivované dermální fibroblasty používané v různých *in vitro* experimentech byly fixovány pomocí 4 % PFA po dobu 20 min při pokojové teplotě a následně permeabilizovány pomocí 0,25 % Triton X-100 po dobu 10 min při pokojové teplotě. Po blokování nespecifické vazby pomocí 2 % BSA v PBS po dobu 60 min při pokojové teplotě pak byly řezy nebo fibroblasty inkubovány (a) s monoklonálními králičími anti-S100A4 protilátkami (1:1000, přes noc při 4 °C) (Zibert J. et al., 2010), (b) s monoklonálními myšimi anti- α -smooth muscle actin (anti- α SMA) protilátkami (1:500, přes noc při 4°C, klon 1A4; Sigma-Aldrich), (c) s monoklonálními myšimi anti-prolyl-4-hydroxyláza-beta (anti-P4H) protilátkami (1:50, přes noc při 4°C, Acris Antibodies, Herford, Německo), (d) s polyklonálními kozími anti-fosforylované-Smad2/3 (anti-p-Smad2/3) protilátkami (1:50, přes noc při 4°C, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Německo). Protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (HRP) (1:200, Dako) anebo fluorescenční protilátky Alexa Fluor (1:200, 488 – zelená fluorescence, 594 – červená fluorescence, všechny od Life Technologies, Darmstadt, Německo) byly použity jako sekundární protilátky. Kontrolní barvení bylo provedeno stejným způsobem, ale

s vynecháním primární protilátky. Řezy barvené imunohistochemicky primárními protilátkami proti S100A4 a α SMA byly vizualizovány pomocí substrátu DAB (diaminobenzidine peroxidase substrate solution (Sigma-Aldrich)). Řezy barvené imunohistochemicky primárními protilátkami proti P4H byly vizualizovány pomocí substrátu Fast Blue BB (Sigma-Aldrich). Řezy myší kůže barvené imunohistochemicky primárními protilátkami proti α SMA byly navíc dobarveny Mayerovým hematoxylinem pro vizualizaci jader. U všech imunofluorescenčních barvení byla jádra vizualizována pomocí DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol (Santa Cruz Biotechnology)). Zmíněná barvení byla fotografována pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Badhoevedorp, Holandsko). Intenzita fluorescence byla kvantifikována pomocí software ImageJ, verze 1.44.

3.11 Model bleomycinem indukované kožní fibrózy

Yamamoto a spoluautoři popsali, že lokalizovaná dermální fibróza může být indukovaná opakovanými subkutánními injekcemi bleomycinu do předem oholené myší kůže. Tento model napodobuje časnou, zánětlivou fázi SSc (Umezawa H. et al., 1967; Yamamoto T., Nishioka K., 2005; Yamamoto T. et al., 1999; Yoshizaki A. et al., 2008). Pro účely sledování funkčních důsledků inaktivace S100A4 v tomto modelu experimentální kožní fibrózy jsme použili S100A4 knock-out myši (S100A4^{-/-}), které mají nulovou expresi S100A4 ve tkáních a jako kontroly posloužily S100A4 wild-type myši (S100A4^{+/+}), které mají normální expresi S100A4 (EL Naaman C. et al., 2004). Bleomycin rozpuštěný ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl) v koncentraci 0,5 mg/ml (celkový objem 100 μ l) byl aplikován injekcemi subkutánně do předem definované a vyholené oblasti mezi lopatkami (o velikosti 1 cm x 1 cm) 6-týdenních myší každý druhý den po dobu 4 týdnů. Podkožní injekční aplikace 100 μ l fyziologického roztoku (0,9 % NaCl) za zachování stejných podmínek sloužila jako kontrola. Celkem jsme analyzovali 4 skupiny myší: n = 9 pro S100A4^{+/+} NaCl, n = 6 pro S100A4^{+/+} bleomycin, n = 7 pro S100A4^{-/-} NaCl, n = 6 pro S100A4^{-/-} bleomycin. Po 4 týdnech byly myši usmrceny dislokací krční páteře a kůže byla analyzována níže popsaným způsobem. Všechny experimenty na myších byly předem schváleny místní etickou komisí.

3.12 Model Tight skin-1 myší

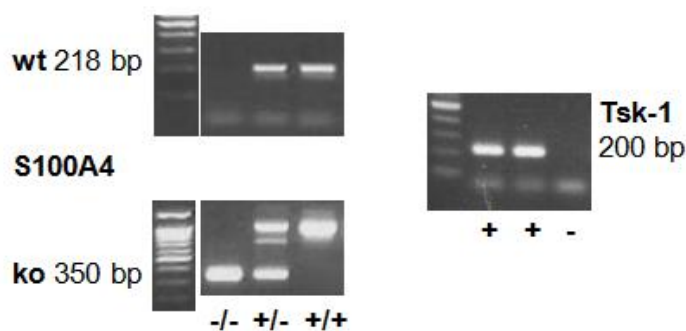
Pro zkoumání funkčních důsledků inaktivace S100A4 v dalším experimentálním modelu, který napodobuje pozdní, na zánětu již nezávislou fázi SSc, jsme použili Tight skin-1 (Tsk-1) myši. Autozomálně dominantní mutace - tandemová duplikace v genu pro fibrillin 1, který je důležitým regulátorem TGF- β signální kaskády a fibrogenese, vede

u heterozygotních myší (značeny Tsk-1) k hyperplázii a ztuhnutí podkoží. Jako kontrolní skupina byly použity pa/pa myši, které nenesou mutaci Tsk-1. U pa/pa myší indukuje recesivní mutace (pa) světle šedé zbarvení srsti a ružové zbarvení očí. Jelikož je gen pro fibrillin 1 geneticky vázán na gen pa, může být mutace Tsk-1 u potomků křížení Tsk-1 a pa/pa myší odhalena i bez genotypizace pomocí zbarvení jejich kůže a očí. Všechny myši s černou srstí a černýma očima nesou dominantní mutaci Tsk-1 a jsou heterozygoty pro recesivní mutaci pa. Naopak všechny myši se světle šedou srstí a růžovýma očima nenesou dominantní Tsk-1 mutaci, ale jsou homozygoty pro recesivní mutaci pa. Kromě barevných změn srsti a očí nezpůsobuje recesivní mutace pa žádnou změnu ve fyziologii kůže nebo fibrogenezi (Baxter R. et al., 2005; Green M. et al., 1976; Menton D., Hess R., 1980; Menton D. et al., 1978; Saito E. et al., 2002; Siracusa L. et al., 1996).

Pro zkoumání účinků inaktivace S100A4 v tomto modelu experimentální kožní fibrózy jsme křížili S100A4^{-/-} a S100A4^{+/+} myši (EL Naaman C. et al., 2004) s myši Tsk-1 a pa/pa. Genotypizace myší byla provedena z 2 mm ústřížků ocasu 3-týdenních myší pomocí PCR (obr. 5) s použitím primerů uvedených v tab. 4. Celkem byly analyzovány 4 skupiny myší: n = 10 pro S100A4^{+/+} pa/pa, n = 8 pro S100A4^{+/+} Tsk-1, n = 10 pro S100A4^{-/-} pa/pa, n = 11 pro S100A4^{-/-} Tsk-1. Ve věku 10 týdnů byly myši usmrceny dislokací krční páteře a kůže byla analyzována níže popsaným způsobem. Všechny experimenty na myších byly předem schváleny místní etickou komisí.

primer	sekvence (5' → 3')
mutovaný fibrillin 1/Tsk-1 fwd	GTTGGCAACTATACCTGCAT
mutovaný fibrillin 1/Tsk-1 rev	CCTTTCCTGGTAACATAGGA
S100A4 knock-out alela fwd	GAGGTCCATCTCTTAGAGAGTTGGC
S100A4 knock-out alela rev	GCACATGTGCGAAGAAGCCAGAGTA
S100A4 wild-type alela fwd	CTGCCCTTAGGTCTCAACGGTTACC
S100A4 wild-type alela rev	CCTCCTCCTGCAGATGCATCACGTG

Tab. 4: Sekvence použitých primerů pro genotypizaci myší pomocí PCR



Obr. 5: Genotypizace potomků křížení $S100A4^{-/-}$ a $S100A4^{+/+}$ myši s Tsk-1 a pa/pa myšmi
 $S100A4^{-/-}$, $S100A4$ knock-out myši; $S100A4^{+/+}$, $S100A4$ wild-type myši; Tsk-1, Tight skin-1 myši; pa/pa, myši nenesoucí mutaci Tsk-1; wt, wild-type alela pro $S100A4$; ko, knock-out alela pro $S100A4$; bp, páry bází

3.13 Histologická analýza tloušťky kůže

Část zkoumané myši kůže (3 mm x 10 mm) byla po usmrcení myši excidována a fixována ve 4 % PFA po dobu 6 hodin při pokojové teplotě před zalitím do parafinu a přípravou histologických preparátů o tloušťce 5 μ m dle standardních protokolů. Kožní řezy pak byly deparafinizovány a obarveny hematoxylinem (10 min) a eozinem (3 min) podle standardního protokolu. Fotografie 4 náhodných úseků barvených preparátů byly pořízeny pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon) ve 100-násobném (pro model bleomycinem indukované kožní fibrózy) nebo 40-násobném zvětšení (pro model Tsk-1 myši). Tloušťka dermis u modelu bleomycinem indukované kožní fibrózy byla měřena mezi epidermodermální juncí a dermohypodermální juncí na 6 různých místech každé fotografie (viz obr. 22A). Tloušťka hypodermis u modelu Tsk-1 myši byla měřena mezi dvěma svalovými vrstvami ohraničujícími hypodermis na 6 různých místech každé fotografie (viz obr. 26A). Stanovení tloušťky kůže bylo provedeno dvěma nezávislými absolventy PhD studia zaslepeným způsobem.

3.14 Stanovení obsahu hydroxyprolinu v kůži

Jelikož je hydroxyprolin hlavní součástí kolagenu, je stanovení hydroxyprolinu běžnou metodou jak pro kvantifikaci obsahu kolagenu, tak i jeho metabolismu ve tkáních (Woessner J., 1961). Ze zkoumané kůže byly pomocí bioptického průbojníku získány kruhové biopsie o průměru 3 mm, které byly natráveny pomocí 6 M HCl po dobu 3 h při teplotě 120 °C. Následně bylo upraveno pH na rozmezí 6 - 7 pomocí náležitého množství 6 M NaOH. Hydrolyzáty byly naředěny 1:10 ve vodě a 250 μ l vzorku bylo použito k měření. Standardy a

hydrolyzáty byly smíchány s 0,06 M chloraminu T a inkubovány po dobu 20 min při pokojové teplotě k zahájení oxidace hydroxyprolinu. Následně byla přidána 3,15 M kyselina perchlorová (HClO₄) za účelem zničení chloraminu T v průběhu inkubace po dobu 5 min. Po přidání 20 % p-dimethylaminobenzaldehydu byly vzorky dobře promíchány a inkubovány 20 min ve vodní lázni o teplotě 60 °C. Absorbance výsledného barevného produktu byla změřena při vlnové délce 557 nm pomocí mikrodestičkového spektrofotometru Spectra MAX 190 microplate spectrophotometer (Molecular Devices) a koncentrace hydroxyprolinu ve vzorku pak byla stanovena pomocí standardní křivky (všechny použité chemikálie byly od Sigma-Aldrich).

Pro histologickou vizualizaci obsahu kolagenu ve zkoumané kůži byly histologické kožní preparáty obarveny modrým Weigertovým trichromem (barví kolagen modře, jádra černě a cytoplasmu, svaly a erytrocyty červeně) podle standardních protokolů a reprezentativní fotografie byly pořízeny pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon) ve 100-násobném (pro model bleomycinem indukované kožní fibrózy) nebo 40-násobném zvětšení (pro model Tsk-1 myši).

3.15 Stanovení počtu myofibroblastů v kůži

Detekce myofibroblastů pomocí imunohistochemického barvení s použitím primárních anti- α SMA protilátek a pomocí dobarvení jader hematoxylinem je popsáno v sekci 3.10. Fotografie 6 náhodných úseků zkoumané kůže byly pořízeny pomocí mikroskopu Nikon Eclipse 80i (Nikon) ve 200-násobném zvětšení (pro oba myší modely). Stanovení počtu α -SMA pozitivních myofibroblastů v kůži bylo provedeno dvěma nezávislými absolventy PhD studia zaslepeným způsobem.

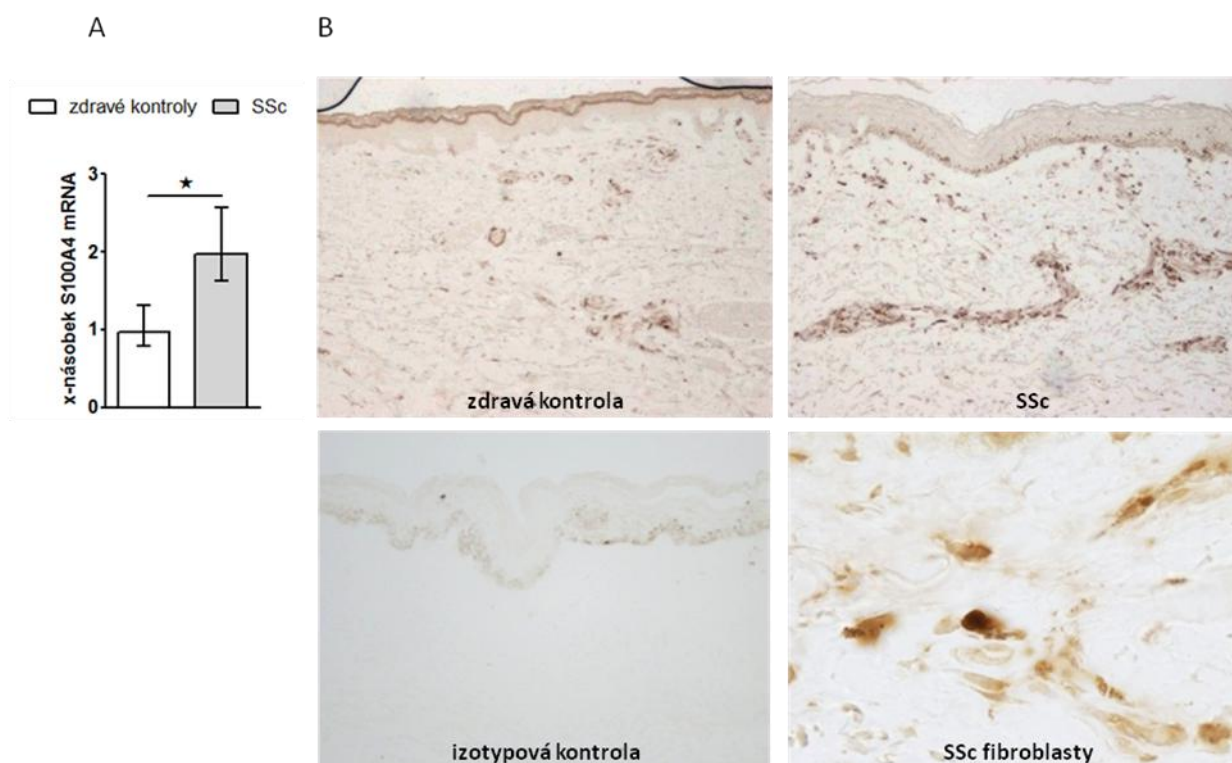
3.16 Statistická analýza

Všechna data v grafech jsou prezentována jako medián s IQR (interquartile range, tj. rozdíl mezi 75. a 25. percentilem). Kvantifikace procentuálního nárůstu nebo poklesu v textu je stanovena pomocí průměrů jednotlivých parametrů. Pro výpočet statistické významnosti rozdílů dané proměnné mezi dvěma skupinami byl použit neparametrický Mann-Whitney test. Statistické analýzy a konstrukce grafů byly provedeny pomocí software GraphPad Prism 5. Hladiny významnosti (p-hodnoty) jsou prezentovány v grafech následovně: *, $0,05 > p > 0,01$; **, $0,01 > p > 0,001$; ***, $p < 0,001$; NS, nesignifikantní. Hladina významnosti $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

4 VÝSLEDKY

4.1 Exprese S100A4 je zvýšená u SSc

Zkoumání role S100A4 proteinu u systémové sklerodermie jsme zahájili analýzou jeho exprese v postižené kůži biptované u pacientů se SSc jak na úrovni mRNA - pomocí RT-PCR, tak na proteinové úrovni – pomocí metod imunohistochemie a imunofluorescence. Prokázali jsme, že exprese S100A4 byla v postižené kůži pacientů se SSc ve srovnání s kůží zdravých jedinců zvýšená jak na úrovni mRNA (nárůst o 102 %, $p = 0,0303$) (obr. 6A), tak na proteinové úrovni (obr. 6B). U zdravých kontrol byla exprese S100A4 nízká a omezena na fibroblasty a cévy dermis a keratinocyty epidermis. Naproti tomu byl S100A4 protein u SSc výrazně exprimován SSc fibroblasty, hlavně v papilární vrstvě dermis (obr. 6B – detail SSc fibroblastů). Keratinocyty i endoteliální buňky v SSc kůži rovněž exprimovaly S100A4 protein - intenzita a charakter barvení na S100A4 se však nelišily od kůže zdravých jedinců.



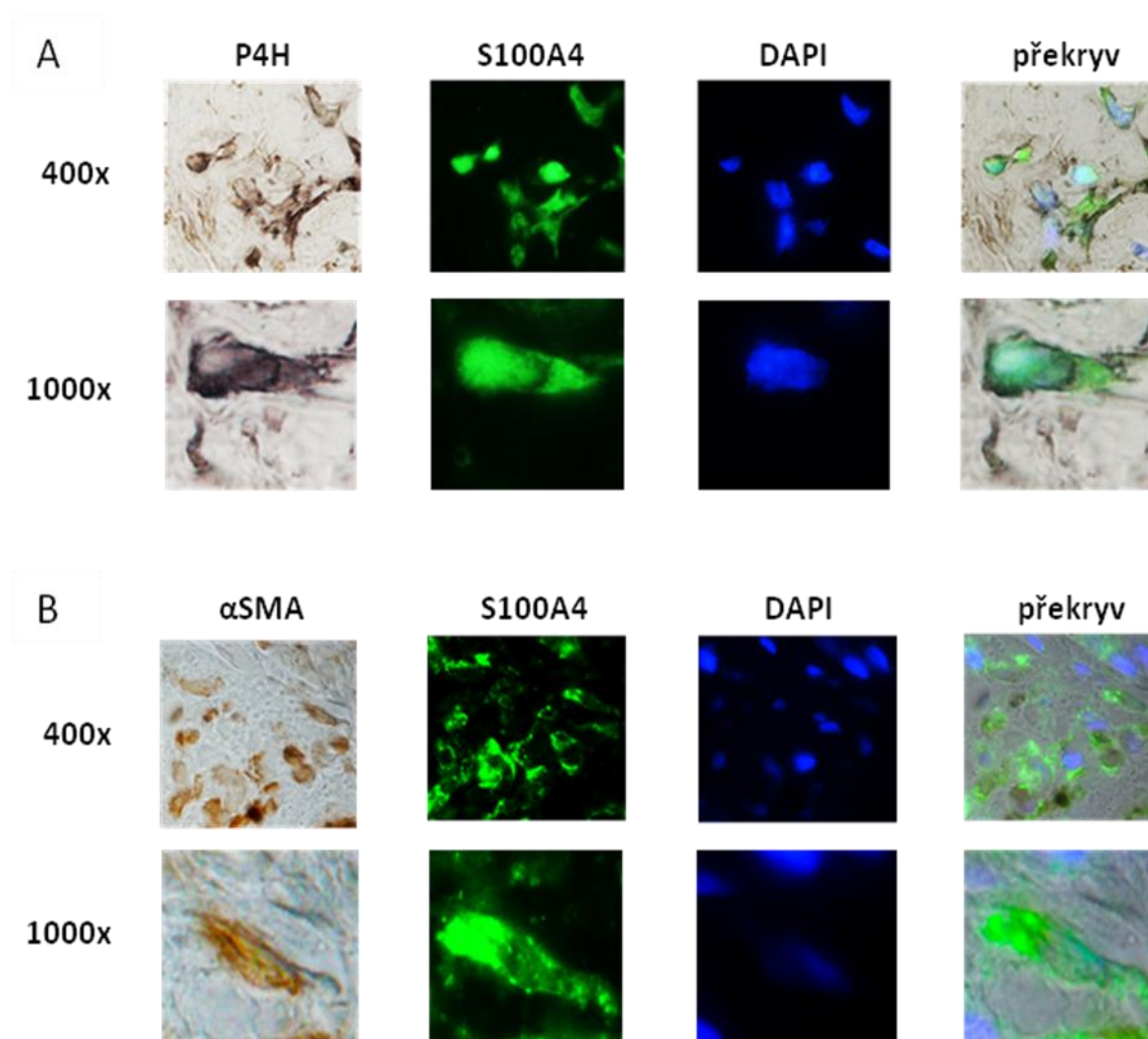
Obr. 6: Exprese S100A4 je zvýšená v SSc kůži

A: Exprese S100A4 mRNA je zvýšená v SSc kůži ve srovnání s kůží zdravých jedinců ($n = 6$).

B: Zvýšená exprese S100A4 proteinu (barvený hnědě) byla detekována v papilární dermis kůže pacientů se SSc ($n = 10$) ve srovnání s kůží zdravých kontrol ($n = 10$). Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení jsou prezentovány v 200- a 1000-násobném (detail SSc fibroblastů) zvětšení.

SSc, systémová sklerodermie

Dále nás zajímalo, které struktury kůže pacientů se SSc zvýšeně exprimují S100A4 protein. Jelikož v patogenezi fibrózy u SSc hrají hlavní roli fibroblasty a zejména aktivované fibroblasty, tzv. myofibroblasty, zaměřili jsme se na tyto struktury kůže. Pomocí metod imunofluorescence s použitím protilátek proti buněčně specifickým markerům – prolyl 4-hydroxyláza (P4H, marker fibroblastů) a α -smooth muscle actin (α -SMA, marker myofibroblastů, pericytů) – jsme prokázali, že jak SSc fibroblasty (obr. 7A) tak i aktivované fibroblasty, tzv. myofibroblasty, v SSc kůži (obr. 7B) výrazně exprimují S100A4 protein.



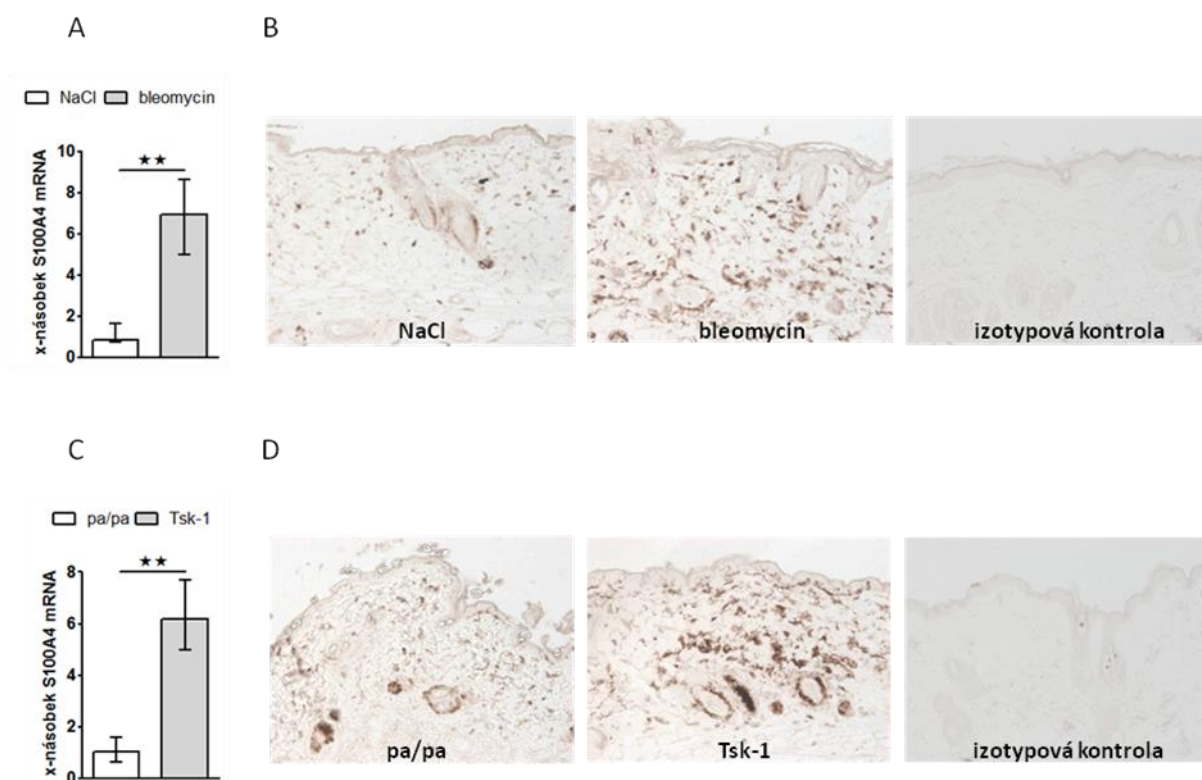
Obr. 7: Kolokalizace exprese S100A4 s fibroblasty a myofibroblasty v SSc kůži

A: Fibroblasty exprimující prolyl-4-hydroxylázu (tmavě hnědá) zvýšeně exprimují S100A4 protein (zelená fluorescence) v SSc kůži. Jádra buněk byla dobarvená pomocí DAPI (modrá fluorescence).

B: Myofibroblasty exprimující α -smooth muscle actin (hnědá) zvýšeně exprimují S100A4 protein (zelená fluorescence) v SSc kůži. Jádra buněk byla dobarvená pomocí DAPI (modrá fluorescence). Reprezentativní obrázky imunohistochemie/imunofluorescence jsou prezentovány v 400- a 1000-násobném zvětšení.

P4H, prolyl 4-hydroxyláza, DAPI, 4',6-diamidin-2-fenylindol; α -SMA, α -smooth muscle actin

Po zjištění zvýšené exprese S100A4 v kůži pacientů se SSc nás zajímalo, jakým způsobem je S100A4 exprimován v experimentálních modelech kožní fibrózy. Proto jsme provedli analýzu S100A4 na úrovni mRNA (pomocí RT-PCR) i proteinové úrovni (pomocí metod imunohistochemie) v kůži biopsované z myších modelů bleomycinem indukované kožní fibrózy a Tight skin-1 (Tsk-1) myší. V souladu s výsledky v kůži pacientů se SSc byl S100A4 zvýšeně exprimován ve fibrotické kůži myší indukované bleomycinem jak na úrovni mRNA (nárůst o 585 %, $p = 0,0060$) (obr. 8A), tak na proteinové úrovni (obr. 8B) ve srovnání s kontrolní kůží, do které byl subkutánně aplikován fyziologický roztok (NaCl). V dalším modelu experimentální kožní fibrózy byl u Tsk-1 myší S100A4 rovněž zvýšeně exprimován ve fibrotické kůži jak na úrovni mRNA (nárůst o 530 %, $p = 0,0033$) (obr. 8C), tak i na proteinové úrovni (obr. 8D) ve srovnání s kontrolní kůží myší, které nenesly mutaci Tsk-1 (pa/pa).



Obr. 8: Expres S100A4 je zvýšená u experimentální kožní fibrózy

A: Expres S100A4 mRNA je zvýšená ve fibrotické kůži myší indukované bleomycinem ve srovnání s kontrolní kůží myší, kterým byl subkutánně podáván fyziologický roztok ($n = 6$).

B: Zvýšená expres S100A4 proteinu (barvený hnědě) byla detekována ve fibrotické kůži myší indukované bleomycinem ve srovnání s kontrolní kůží myší, kterým byl subkutánně podáván fyziologický roztok ($n = 5$).

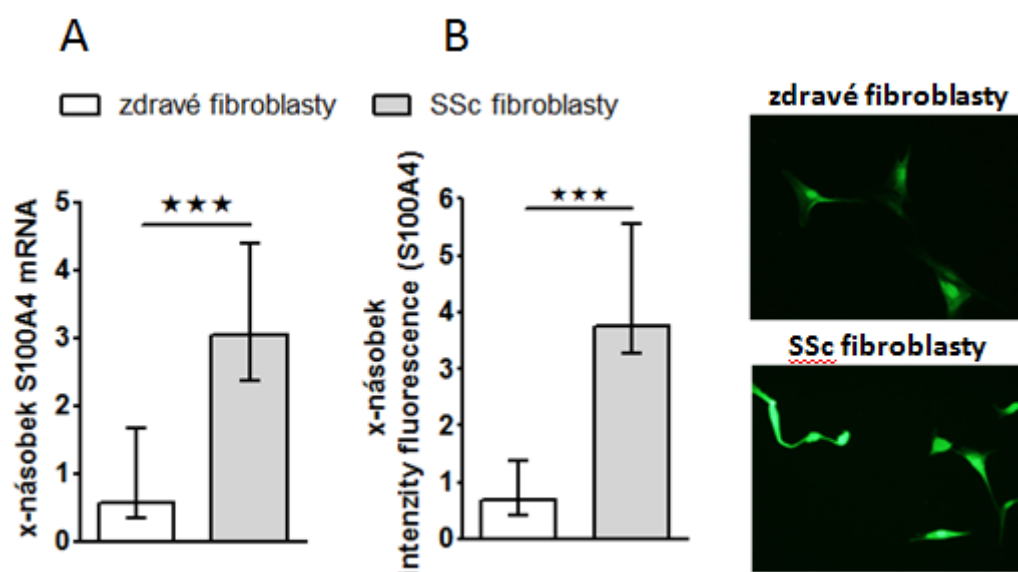
C: Expres S100A4 mRNA je zvýšená ve fibrotické kůži Tight skin-1 myší ve srovnání s kontrolní kůží myší, které nemají Tsk-1 mutaci (pa/pa) ($n = 6$).

D: Zvýšená expres S100A4 proteinu (barvený hnědě) byla detekována ve fibrotické kůži Tight skin-1 myší ve srovnání s kontrolní kůží myší, které nemají Tsk-1 mutaci (pa/pa) ($n = 5$). Reprezentativní obrázky imunohistochemického barvení jsou prezentovány ve 200-násobném zvětšení.

NaCl, fyziologický roztok; pa/pa, kontrolní myši nenesoucí mutaci Tsk-1; Tsk-1, Tight skin-1 myši

4.2 TGF- β indukuje expresi S100A4 v závislosti na Smad3

Po zjištění zvýšené exprese S100A4 v kůži pacientů se SSc a u experimentální kožní fibrózy nás zajímalo, jak je S100A4 exprimován ve fibroblastech izolovaných z explantové postižené kůže pacientů se SSc ve srovnání s fibroblasty izolovanými z kůže zdravých jedinců. Pro analýzu exprese S100A4 v dermálních fibroblastech jsme zvolili metody RT-PCR a imunofluorescence. Zjistili jsme, že zvýšená exprese S100A4 byla zachována i v kultivovaných SSc fibroblastech, které si udržely zvýšenou expresi jak na úrovni mRNA (nárůst o 233 %, $p < 0,0001$) (obr.9A), tak i na proteinové úrovni (nárůst o 311 %, $p = 0,0001$) (obr. 9B) ve srovnání s kontrolními zdravými fibroblasty i po několika pasážích v tkáňových kulturách.



Obr. 9: Expres S100A4 je zvýšená v SSc fibroblastech

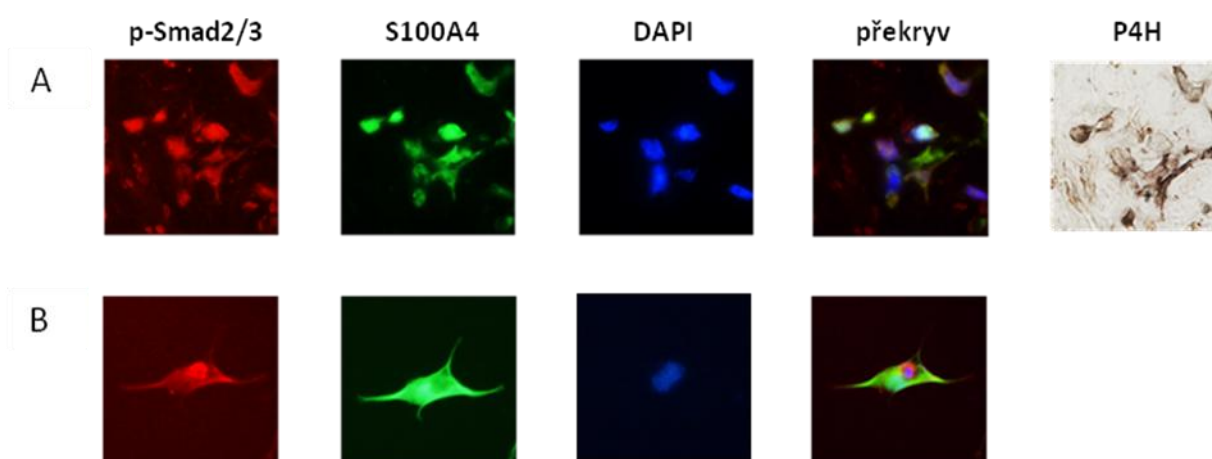
A: Expres S100A4 mRNA je zvýšená v SSc dermálních fibroblastech ve srovnání se zdravými dermálními fibroblasty ($n = 6$).

B: Expres S100A4 proteinu (zelená fluorescence) je zvýšená v SSc dermálních fibroblastech ve srovnání se zdravými dermálními fibroblasty ($n = 4$). Reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení jsou prezentovány v 1000-násobném zvětšení.

SSc, systémová sklerodermie

Dermální fibroblasty izolované z postižené kůže pacientů se SSc mají abnormální, aktivovaný fenotyp, který je signál-independentní a přetrvává po několik pasáží *in vitro* (LeRoy E., 1974). Aberantně aktivovaná TGF- β signální kaskáda je společnou charakteristikou fibrotických onemocnění včetně SSc a perzistentně zvýšená aktivita této signální kaskády přispívá k aktivovanému fenotypu kultivovaných SSc fibroblastů. Stimulace kultivovaných zdravých fibroblastů pomocí TGF- β v nich navodí fenotyp podobný aktivovanému fenotypu

SSc fibroblastů. Pomocí metod imunofluorescence s použitím protilátek proti centrálním mediátorům Smad-dependentní TGF- β signální kaskády – fosforylovanému Smad2 a Smad3 proteinu (p-Smad2/3) – jsme prokázali, že S100A4 pozitivní fibroblasty v postižené kůži pacientů se SSc jednotně exprimují fosforylovaný Smad2/3, což demonstruje aktivaci kanonické TGF- β signální kaskády ve fibroblastech exprimujících S100A4 (obr. 10A). Obdobnou kolokalizaci exprese p-Smad2/3 a S100A4 proteinu jsme prokázali v kultivovaných zdravých dermálních fibroblastech stimulovaných pomocí TGF- β (obr. 10B).



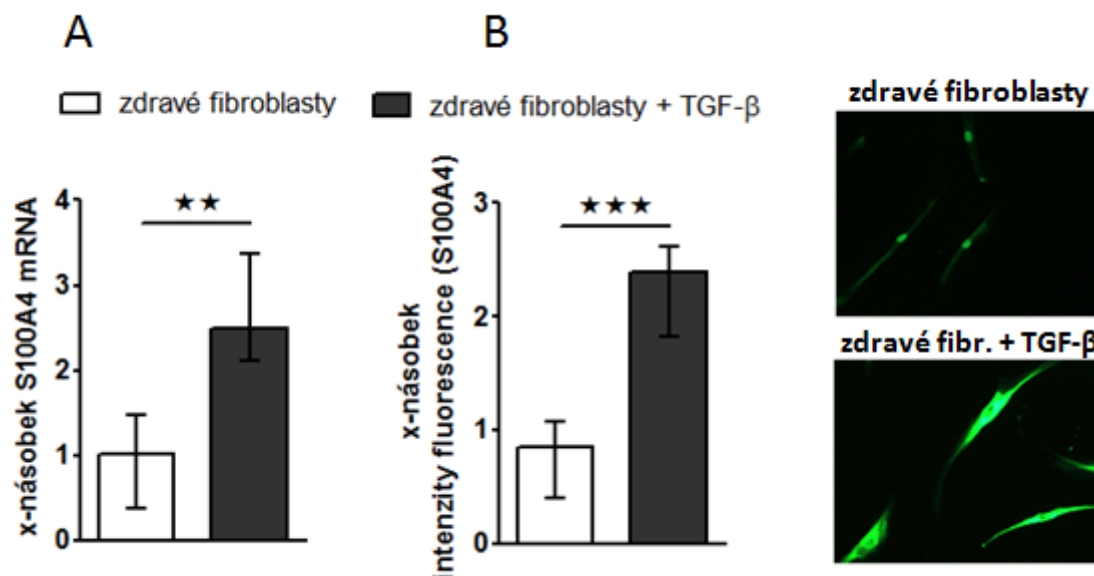
Obr. 10: Kolokalizace exprese S100A4 a p-Smad2/3 v SSc kůži a v aktivovaných fibroblastech

A: Ve fibroblastech kůže pacientů se SSc exprimujících prolyl-4-hydroxylázu (tmavě hnědá) kolokalizuje exprese S100A4 proteinu (zelená fluorescence) s expresí fosforylovaných Smad2/3 proteinů (červená fluorescence). Jádra buněk byla dobarvená pomocí DAPI (modrá fluorescence).

B: V kultivovaných zdravých dermálních fibroblastech aktivovaných pomocí TGF- β kolokalizuje exprese S100A4 proteinu (zelená fluorescence) s expresí fosforylovaných Smad2/3 proteinů (červená fluorescence). Jádra buněk byla dobarvená pomocí DAPI (modrá fluorescence). Reprezentativní obrázky imunohistochemie/imunofluorescence jsou prezentovány v 400- (A) a 1000-násobném (B) zvětšení.

p-Smad2/3, fosforylované Smad2 a Smad3 proteiny; DAPI, 4',6-diamidin-2-fenylyndol; P4H, prolyl 4-hydroxyláza

Proto jsme dále předpokládali, že aktivovaná TGF- β signální kaskáda v SSc fibroblastech může stimulovat expresi S100A4. Abychom potvrdili tuto hypotézu, stimulovali jsme zdravé dermální fibroblasty pomocí hlavního profibrotického cytokinu, TGF- β , což vedlo k navození fenotypu podobného aktivovanému fenotypu SSc fibroblastů a analyzovali jsme expresi S100A4 na úrovni mRNA (pomocí RT-PCR) i proteinové úrovni (pomocí metod imunofluorescence). Inkubace fibroblastů izolovaných z kůže zdravých jedinců s TGF- β zvýšila expresi S100A4 jak na úrovni mRNA (nárůst o 174 %, $p = 0,0017$) (obr. 11A) tak i na proteinové úrovni (nárůst o 129 %, $p < 0,0001$) (obr. 11B).



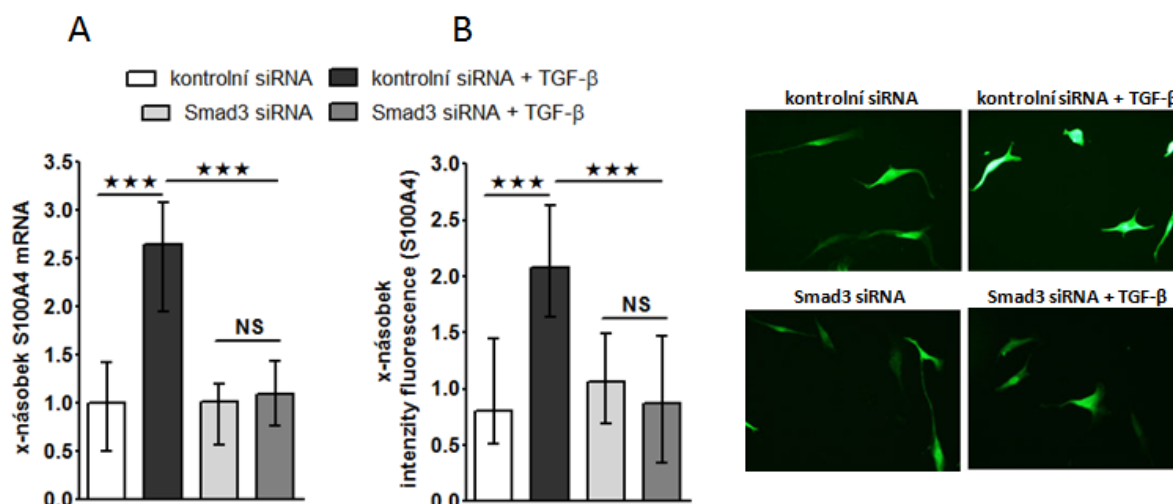
Obr. 11: Stimulace zdravých fibroblastů pomocí TGF-β indukuje expresi S100A4

A: Expres S100A4 mRNA je zvýšená ve zdravých dermálních fibroblastech stimulovaných pomocí TGF-β ve srovnání se zdravými nestimulovanými dermálními fibroblasty (n = 10).

B: Expres S100A4 proteinu (zelená fluorescence) je zvýšená ve zdravých dermálních fibroblastech stimulovaných TGF-β ve srovnání se zdravými nestimulovanými dermálními fibroblasty (n = 4). Reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení jsou prezentovány v 1000-násobném zvětšení.

TGF-β, transformující růstový faktor β

Dále jsme chtěli zjistit, zda-li je indukce exprese S100A4 ve zdravých fibroblastech stimulovaných TGF-β zprostředkována Smad-dependentní TGF-β signální kaskádou. Pro tyto účely jsme transfekovali zdravé dermální fibroblasty se Smad3 siRNA a stimulovali pomocí TGF-β a následně analyzovali expresi S100A4 pomocí RT-PCR a metod imunofluorescence. Prokázali jsme, že zvýšení exprese S100A4 po stimulaci TGF-β je závislé na TGF-β / Smad signální kaskádě, protože inhibice exprese Smad3 pomocí Smad3 siRNA utlumilo stimulační účinky TGF-β na expresi S100A4 jak na úrovni mRNA (nárůst o 157 % u fibroblastů transfekovaných kontrolní siRNA, p = 0,0002; nárůst o 10 % u fibroblastů transfekovaných Smad3 siRNA, p = 0,5054) (obr. 12A) tak i na proteinové úrovni (nárůst o 117 % u fibroblastů transfekovaných kontrolní siRNA, p = 0,0005; nárůst o 0 % u fibroblastů transfekovaných Smad3 siRNA, p = 0,5355) (obr. 12B).



Obr. 12: Expres S100A4 je indukovaná ve zdravých fibroblastech pomocí TGF-β v závislosti na Smad3

A: Indukce exprese S100A4 mRNA pomocí TGF-β ve zdravých fibroblastech je utlumena po inhibici Smad signální kaskády pomocí transfekce se Smad3 siRNA ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolní siRNA (n = 6).

B: Indukce exprese S100A4 proteinu (zelená fluorescence) pomocí TGF-β ve zdravých fibroblastech je utlumena po inhibici Smad signální kaskády pomocí transfekce se Smad3 siRNA ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolní siRNA (n = 4). Reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení jsou prezentovány v 1000-násobném zvětšení.

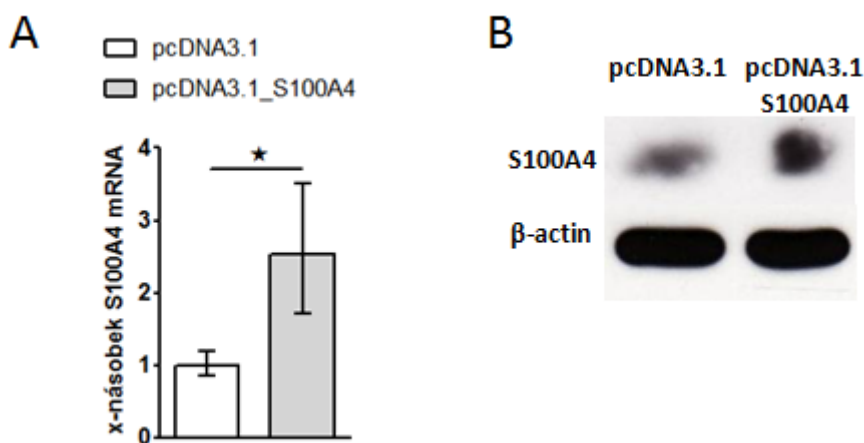
TGF-β, transformující růstový faktor β

4.3 S100A4 indukuje aktivaci fibroblastů a syntézu kolagenu

Abychom mohli zhodnotit funkční důsledky zvýšené exprese S100A4 u SSc, zvolili jsme následující sadu *in vitro* experimentů s dvěma různými přístupy. (I) V prvním přístupu jsme za účelem endogenního zvýšení exprese S100A4 vytvořili S100A4 expresní plasmid (pcDNA3.1_S100A4), transfekovali jej do fibroblastů a analyzovali ovlivnění TGF-β / Smad signální dráhy a syntézu kolagenu. (II) Ve druhém přístupu jsme hodnotili, jestli dokáže extracelulární S100A4 aktivovat TGF-β / Smad signální kaskádu a produkci kolagenu. Inkubovali jsme zdravé fibroblasty s normální expresí S100A4 s různými koncentracemi rekombinantního S100A4 proteinu.

(I) Pro analýzu funkčních důsledků endogenního zvýšení exprese S100A4 jsme transfekovali S100A4 expresní plasmid pcDNA3.1_S100A4 do fibroblastů, což vedlo k indukci exprese S100A4 jak na úrovni mRNA (nárůst o 158 %, p = 0,0170) (obr. 13A) tak i na proteinové úrovni (obr. 13B). Jako kontrola posloužily fibroblasty, do kterých byl transfekován kontrolní plasmid pcDNA3.1 a pro srovnání profibrotických účinků jsme navíc inkubovali obě skupiny fibroblastů s TGF-β. K zhodnocení ovlivnění TGF-β / Smad signální kaskády jsme použili

SBE (Smad binding element) reporter, metody imunofluorescence pro detekci p-Smad2/3 a RT-PCR pro analýzu transkripce klasických genů indukovatelných pomocí TGF- β / Smad signální kaskády - konkrétně PAI-1 a Smad7. K zhodnocení produkce kolagenu jsme použili reporter pro promotor kolagenu 1a2 (colla2 promotor reporter), RT-PCR pro analýzu mRNA exprese kolagenů 1a1, 1a2 a SirCol eseje pro stanovení koncentrace kolagenu produkovaného do supernatantů buněk.



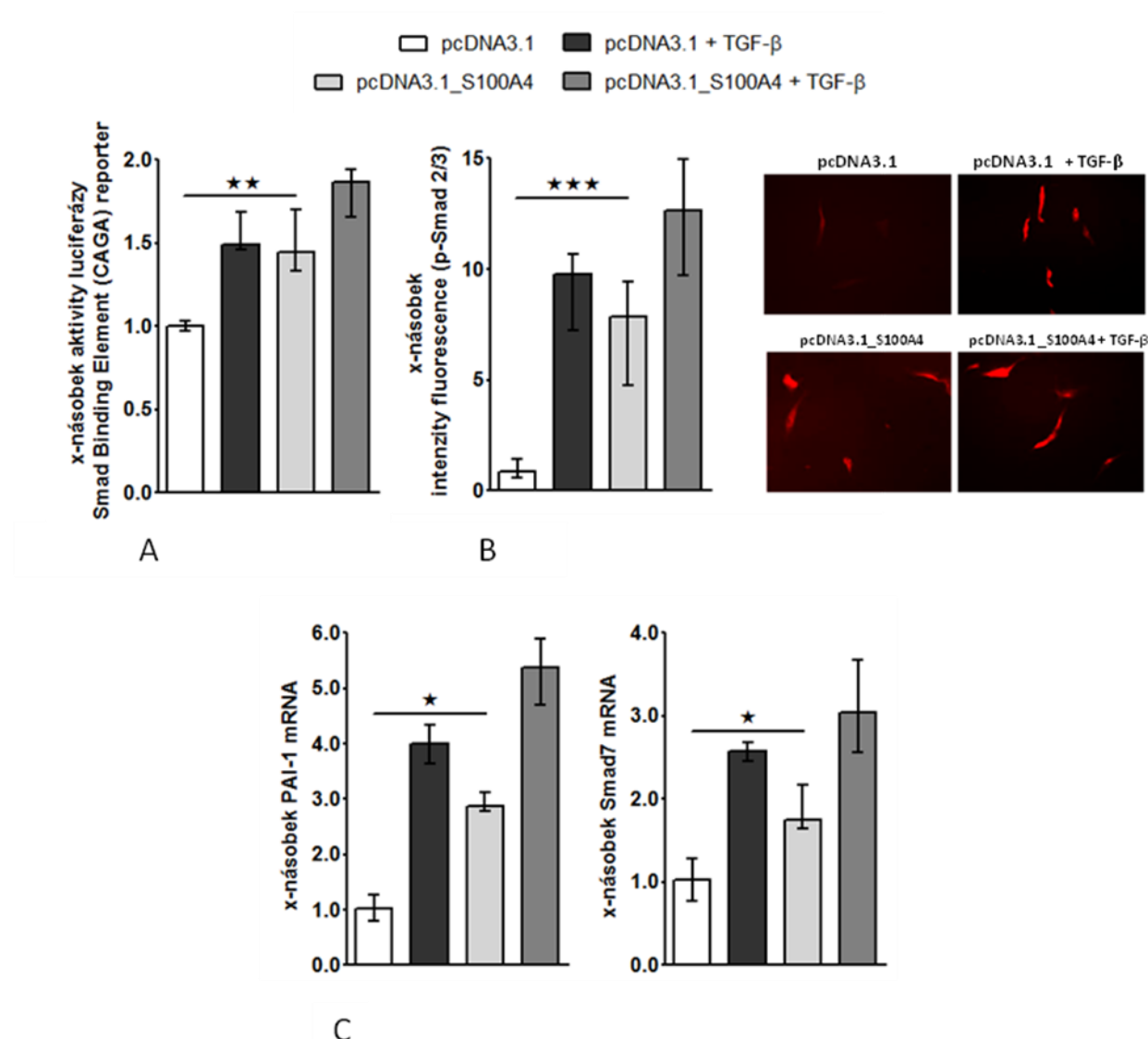
Obr. 13: Indukce exprese S100A4 ve fibroblastech, do kterých jsme transfekovali S100A4 expresní plasmid

A: Zvýšení exprese S100A4 mRNA ve fibroblastech, do kterých jsme transfekovali S100A4 expresní plasmid ve srovnání s fibroblasty, do kterých byl transfekován kontrolní plasmid (n = 6).

B: Zvýšení exprese S100A4 proteinu ve fibroblastech, do kterých jsme transfekovali S100A4 expresní plasmid ve srovnání s fibroblasty, do kterých byl transfekován kontrolní plasmid
pcDNA3.1, kontrolní plasmid; pcDNA3.1_S100A4, S100A4 expresní plasmid

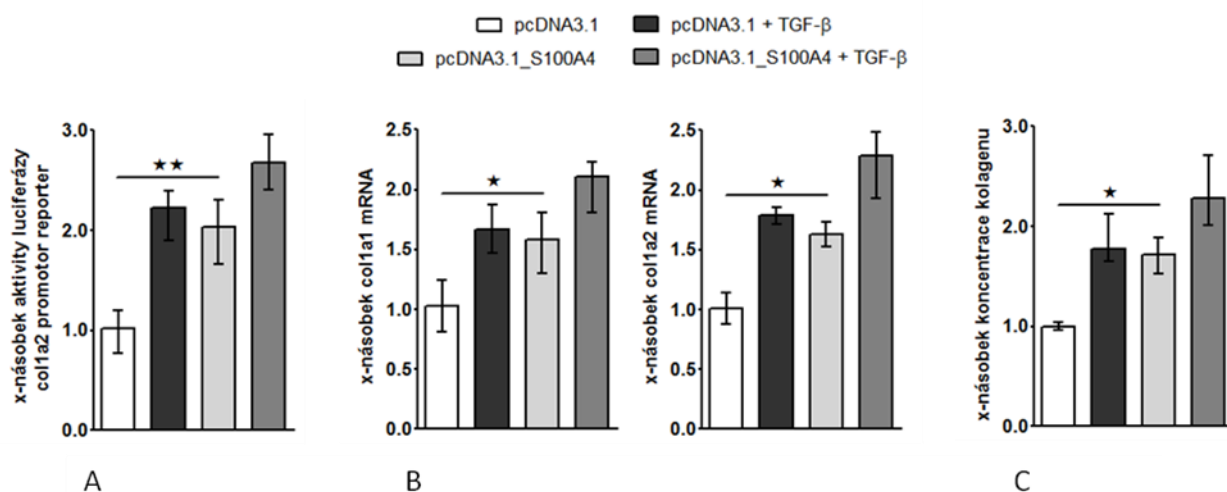
Zvýšení exprese S100A4 pomocí transfekce s pcDNA3.1_S100A4 vektorem vedlo k aktivaci kanonické TGF- β / Smad signální dráhy ve fibroblastech se zvýšením aktivity SBE reporteru (nárůst o 51 %, p = 0,0022) (obr. 14A), se zvýšenou akumulací p-Smad2/3 (nárůst o 643 %, p < 0,0001) (obr. 14B) a s indukcí mRNA exprese typických TGF- β / Smad indukovatelných genů – PAI-1 (nárůst o 193 %, p < 0,0121) a Smad7 (nárůst o 86 %, p = 0,0284) (obr. 14C pro oba). V souladu s aktivací TGF- β / Smad signální kaskády vedlo zvýšení exprese S100A4 k indukci produkce kolagenu. Zvýšená exprese S100A4 stimulovala aktivitu colla2 reporteru (nárůst o 99 %, p = 0,0025) (obr. 15A), indukovala expresi mRNA pro kolagen 1a1 (nárůst o 56 %, p = 0,0248) a kolagen 1a2 (nárůst o 63 %, p = 0,0105) (obr. 15B pro oba) a zvýšila produkci kolagenu fibroblasty do supernatantu (nárůst o 71 %, p = 0,0114) (obr. 15C). Dodatečné zvýšení všech sledovaných parametrů u fibroblastů, do kterých jsme transfekovali S100A4 expresní plasmid pcDNA3.1_S100A4 pomocí inkubace s TGF- β bylo již méně

výrazné než u fibroblastů transfekovaných s kontrolním plasmidem pcDNA3.1, což dále podporuje naše výsledky dokumentující, že TGF- β / Smad signální dráha je již u fibroblastů se zvýšenou expresí S100A4 aktivována a její další aktivace má již menší stimulační účinek (obr. 14A-C, 15A-C).



Obr. 14: S100A4 indukuje aktivaci TGF- β / Smad signální kaskády

Zvýšená exprese S100A4 ve fibroblastech, do kterých jsme transfekovali S100A4 expresní plasmid pcDNA3.1_S100A4, vedla ke zvýšení luciferázové aktivity reportéru pro Smad binding element (A) ($n = 9$), k vyšší akumulaci fosforylovaných Smad2 a Smad3 proteinů (červená fluorescence) (B) ($n = 4$) a indukovala transkripci typických TGF- β / Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 (C pro oba) ($n = 6$ pro oba) ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolním vektorem (pcDNA3.1). Reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení jsou prezentovány v 1000-násobném zvětšení. pcDNA3.1, kontrolní plasmid; pcDNA3.1_S100A4, S100A4 expresní plasmid; TGF- β , transformující růstový faktor beta; p-Smad2/3, fosforylované Smad2 a Smad3 proteiny; PAI-1, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1



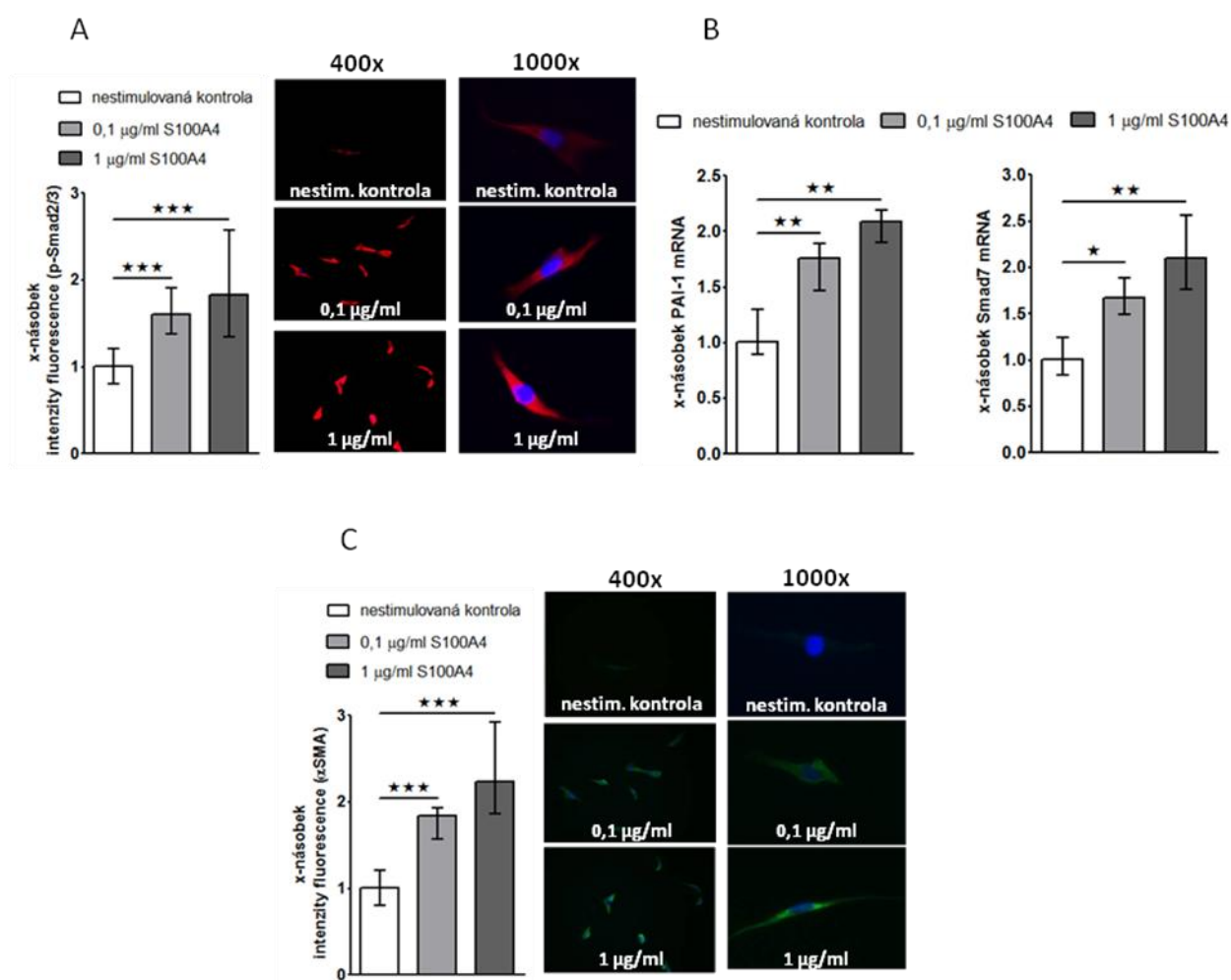
Obr. 15: S100A4 indukuje produkci kolagenu ve fibroblastech

Zvýšená exprese S100A4 ve fibroblastech, do kterých jsme transfekovali S100A4 expresní plasmid pcDNA3.1_S100A4, vedla ke zvýšení luciferázové aktivity reporteru pro promotor kolagenu 1a2 (A) (n = 9), indukovala transkripci genů pro kolagen 1a1 a 1a2 (B pro oba) (n = 6 pro oba) a zvýšila produkci kolagenu do supernatantu (C) (n = 4) ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolním vektorem (pcDNA3.1). pcDNA3.1, kontrolní plasmid; pcDNA3.1_S100A4, S100A4 expresní plasmid; TGF-β, transformující růstový faktor beta; col1a2, kolagen 1a2; col1a1, kolagen 1a1

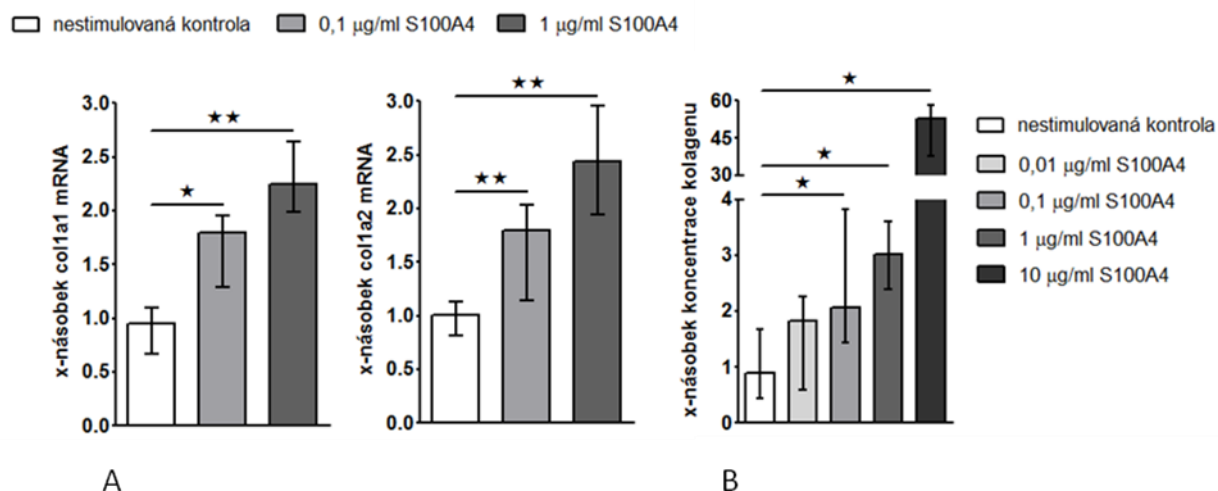
(II) Ve druhém přístupu jsme za účelem zhodnocení účinků extracelulárního S100A4 na aktivaci TGF-β / Smad signální kaskády a produkci kolagenu inkubovali zdravé fibroblasty s normální expesí S100A4 s různými koncentracemi (0,01; 0,1; 1 a 10 µg/ml) rekombinantního S100A4 proteinu. K analýze ovlivnění TGF-β / Smad signální kaskády jsme použili metod imunofluorescence pro detekci p-Smad2/3 a RT-PCR pro analýzu transkripce klasických genů indukovatelných pomocí TGF-β / Smad signální kaskády - PAI-1 a Smad7. Aktivaci fibroblastů jsme hodnotili detekcí exprese α-SMA pomocí imunofluorescence. K zhodnocení produkce kolagenu jsme použili RT-PCR pro analýzu mRNA exprese kolagenů col1a1, col1a2 a SirCol esej pro stanovení koncentrace kolagenu produkovaného do supernatantů buněk.

Inkubace fibroblastů s rekombinantním S100A4 proteinem v koncentracích 0,1 a 1 µg/ml vedla k aktivaci kanonické TGF-β / Smad signální dráhy ve fibroblastech se zvýšenou akumulací p-Smad2/3 (0,1 µg/ml: nárůst o 69 %, p < 0,0001; 1 µg/ml: nárůst o 98 %, p < 0,0001) (obr. 16A), indukci mRNA exprese typických TGF-β / Smad indukovatelných genů – PAI-1 (0,1 µg/ml: nárůst o 67 %, p = 0,0087; 1 µg/ml: nárůst o 107 %, p = 0,0022) a Smad7 (0,1 µg/ml: nárůst o 64 %, p = 0,0161; 1 µg/ml: nárůst o 110 %, p = 0,0043) (obr. 16B pro oba) a zvýšení exprese α-SMA, jakožto markeru aktivace fibroblastů (0,1 µg/ml: nárůst o 85 %, p < 0,0001; 1 µg/ml: nárůst o 134 %, p < 0,0001) (obr. 16C). V souladu s aktivací TGF-β /

Smad signální kaskády a aktivaci fibroblastů vedla inkubace fibroblastů s rekombinantním S100A4 proteinem ke zvýšení produkce kolagenu. Rekombinantní S100A4 protein indukoval expresi mRNA pro kolagen 1a1 (0,1 $\mu\text{g/ml}$: nárůst o 65 %, $p = 0,0103$; 1 $\mu\text{g/ml}$: nárůst o 133 %, $p = 0,0022$) a kolagen 1a2 (0,1 $\mu\text{g/ml}$: nárůst o 69 %, $p = 0,0087$; 1 $\mu\text{g/ml}$: nárůst o 143 %, $p = 0,0022$) (obr. 17A pro oba) a zvýšil produkci kolagenu fibroblasty do supernatantu (0,1 $\mu\text{g/ml}$: nárůst o 144 %, $p = 0,0308$; 1 $\mu\text{g/ml}$: nárůst o 200 %, $p = 0,0286$) (obr. 17B). Zvýšení všech zmíněných parametrů bylo závislé na koncentraci rekombinantního S100A4 proteinu použitého ke stimulaci fibroblastů (obr. 16A-C, 17A-B).



Obr. 16: Rekombinantní S100A4 indukuje aktivaci TGF- β / Smad signální kaskády a aktivuje fibroblasty Inkubace fibroblastů s rekombinantním S100A4 proteinem zvýšila akumulaci fosforylovaných Smad2 a Smad3 proteinů (červená fluorescence) (A) ($n = 4$), indukovala transkripci typických TGF- β / Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 (B pro oba) ($n = 6$ pro oba) a zvýšila expresi α -smooth muscle actin (zelená fluorescence), jakožto markeru aktivace fibroblastů (C) ($n = 4$) ve srovnání s kontrolními nestimulovanými fibroblasty. Zvýšení jednotlivých parametrů je závislé na koncentraci rekombinantního S100A4 proteinu. Jádra jsou dobarvena pomocí DAPI (modrá fluorescence). Reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení jsou prezentovány ve 400- a 1000-násobném zvětšení. p-Smad2/3, fosforylované Smad2 a Smad3 proteiny; PAI-1, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1, α -SMA, α -smooth muscle actin; DAPI, 4',6-diamidin-2-fenylindol



Obr. 17: Rekombinantní S100A4 indukuje tvorbu kolagenu

Inkubace fibroblastů s rekombinantním S100A4 proteinem zvýšila expresi mRNA pro kolagen 1a1 a 1a2 (**A** pro oba) ($n = 6$) a indukovala produkci kolagenu do supernatantu (**B**) ($n = 4$) ve srovnání s kontrolními nestimulovanými fibroblasty. Zvýšení jednotlivých parametrů je závislé na koncentraci rekombinantního S100A4 proteinu.

col1a2, kolagen 1a2; col1a1, kolagen 1a1

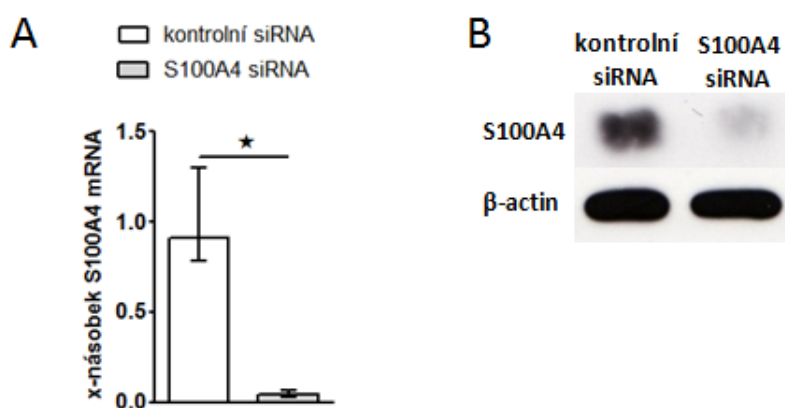
Výsledky obou přístupů demonstrují, že S100A4 aktivuje fibroblasty, je pozitivním regulátorem TGF- β / Smad signální kaskády a amplifikuje stimulační účinky TGF- β na produkci kolagenu.

4.4 Inhibice S100A4 tlumí stimulační účinky TGF- β na fibroblasty

Na podkladě našich dosavadních výsledků, které demonstrují, že TGF- β indukuje expresi S100A4 a S100A4 zpětně aktivuje klidové fibroblasty a TGF- β / Smad signální kaskádu, jsme předpokládali, že by S100A4 mohl být „downstream” mediátorem profibrotických účinků TGF- β . Abychom otestovali tuto hypotézu, provedli jsme následující sadu *in vitro* experimentů s dvěma různými přístupy. (I) V prvním přístupu jsme utlumili expresi S100A4 prostřednictvím transfekce fibroblastů s S100A4 siRNA a analyzovali ovlivnění TGF- β / Smad signální dráhy a syntézu kolagenu. (II) Ve druhém přístupu jsme použili fibroblasty izolované z kůže S100A4 knock-out myši (S100A4^{-/-}), t.j. s kompletním deficitem S100A4, a zhodnotili TGF- β / Smad signální kaskádu a produkci kolagenu. Jednotlivé skupiny fibroblastů jsme pak inkubovali s TGF- β a sledovali efekt inaktivace S100A4 na profibrotické účinky TGF- β .

(I) Pro analýzu funkčních důsledků utlumení exprese S100A4 jsme transfekovali fibroblasty

s S100A4 siRNA, což vedlo k redukci exprese S100A4 jak na úrovni mRNA (pokles o 95 %, $p = 0,0286$) (obr. 18A) tak i na proteinové úrovni (obr. 18B). Jako kontrola posloužily fibroblasty transfekované s kontrolní siRNA. K zhodnocení ovlivnění TGF- β / Smad signální kaskády jsme použili: SBE reporter, metodu imunofluorescence pro detekci p-Smad2/3 a RT-PCR pro analýzu transkripce PAI-1 a Smad7. K zhodnocení produkce kolagenu jsme použili reporter pro promotor kolagenu 1a2, RT-PCR pro analýzu mRNA exprese kolagenů *colla1*, *colla2* a SirCol esej pro stanovení koncentrace kolagenu produkovaného do supernatantů buněk.



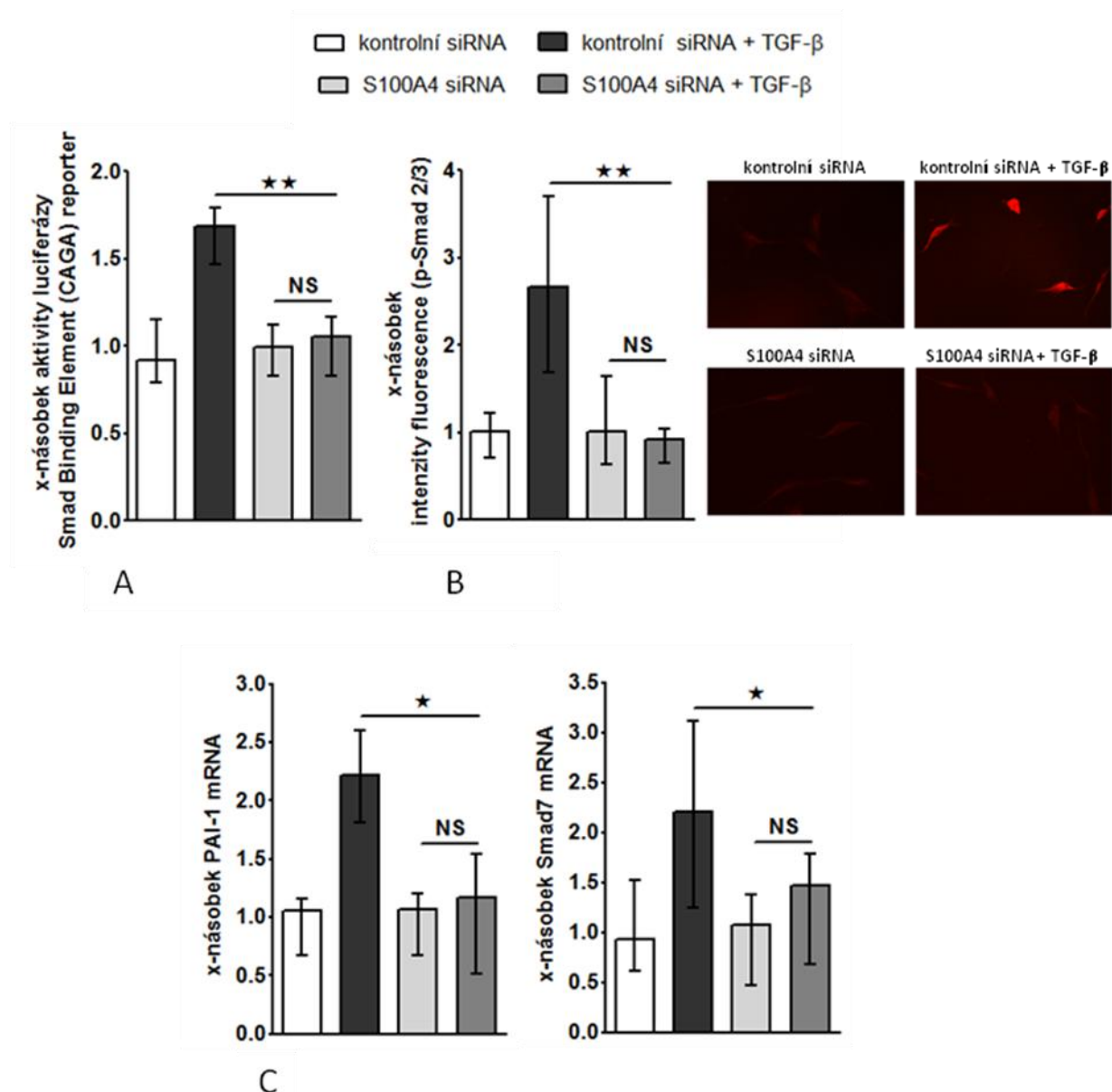
Obr. 18: Redukce exprese S100A4 ve fibroblastech transfekovaných s S100A4 siRNA

A: Snížení exprese S100A4 mRNA ve fibroblastech transfekovaných s S100A4 siRNA ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolní siRNA ($n = 6$).

B: Snížení exprese S100A4 proteinu ve fibroblastech transfekovaných s S100A4 siRNA ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolní siRNA. siRNA, small interfering RNA

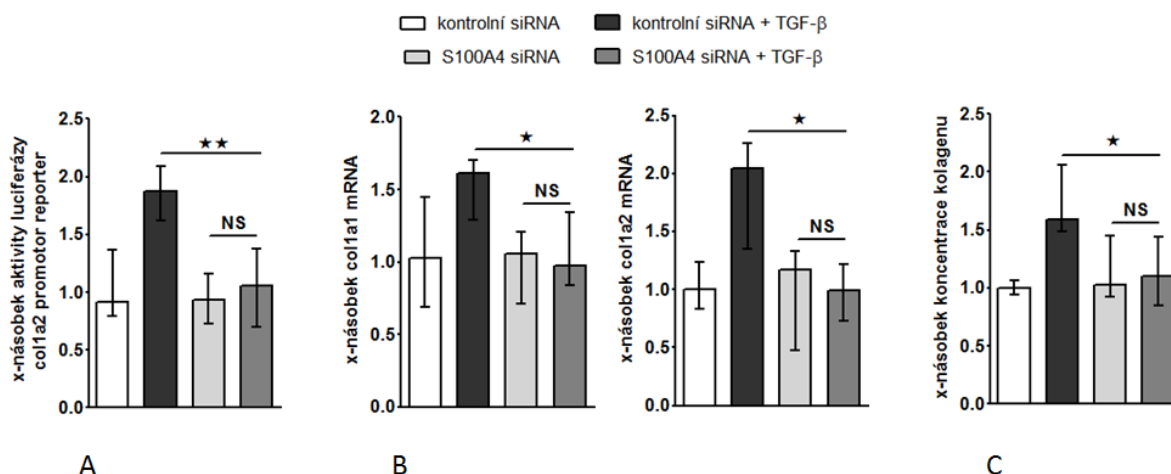
Redukce exprese S100A4 neovlivnila signifikantně expresi TGF- β / Smad indukovatelných genů ani nesnížila bazální sekreci kolagenu v klidových, t.j. nestimulovaných, fibroblastech (obr. 19C, 20A-C). Avšak snížení exprese S100A4 utlumilo TGF- β / Smad signální dráhu u fibroblastů inkubovaných s TGF- β . Ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolní siRNA, u kterých vedla stimulace pomocí TGF- β k očekávané indukci všech sledovaných parametrů, byly fibroblasty transfekované s S100A4 siRNA uchráněny od stimulačních účinků TGF- β a nedošlo u nich: k signifikantní indukci aktivity SBE reporteru (nárůst o 64 % u kontrolní siRNA vs. nárůst o 6 % u S100A4 siRNA, $p = 0,0022$) (obr. 19A), ke zvýšení exprese p-Smad2/3 (nárůst o 176 % u kontrolní siRNA vs. nárůst o 0 % u S100A4 siRNA, $p = 0,0050$) (obr. 19B) či k indukci mRNA exprese typických TGF- β / Smad indukovatelných genů PAI-1 (nárůst o 123 % u kontrolní siRNA vs. nárůst o 11 % u S100A4 siRNA, $p = 0,0130$) a Smad7 (nárůst o 117 % u kontrolní siRNA vs. nárůst o 16 % u S100A4 siRNA, $p = 0,0293$) (obr. 19C pro oba). V souladu s inhibicí TGF- β / Smad signální kaskády u

stimulovaných fibroblastů transfekovaných s S100A4 siRNA nedošlo: k signifikantnímu zvýšení aktivity reporteru pro promotor kolagenu 1a2 (nárůst o 86 % u kontrolní siRNA vs. nárůst o 29 % u S100A4 siRNA, $p = 0,0043$) (obr. 20A), k indukci mRNA exprese kolagenu 1a1 (nárůst 61 o % u kontrolní siRNA vs. nárůst o 3 % u S100A4 siRNA, $p = 0,0493$) a kolagenu 1a2 (nárůst 87 o % u kontrolní siRNA vs. nárůst o 0 % u S100A4 siRNA, $p = 0,0152$) (obr. 20B pro oba) či ke zvýšení produkce kolagenu do supernatantu (nárůst o 71 % u kontrolní siRNA vs. nárůst o 1 % u S100A4 siRNA, $p = 0,0471$) (obr. 20C).



Obr. 19: Inhibice S100A4 pomocí siRNA tlumí stimulační účinky TGF-β na Smad signální kaskádu

Snížená exprese S100A4 ve fibroblastech transfekovaných s S100A4 siRNA utlumila stimulační účinky TGF-β na luciferázovou aktivitu reporteru pro Smad binding element (A) ($n = 9$), na akumulaci fosforylovaných Smad2 a Smad3 proteinů (červená fluorescence) (B) ($n = 4$) či na transkripci typických TGF-β / Smad indukovaných genů PAI-1 a Smad7 (C pro oba) ($n = 6$ pro oba) ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolní siRNA inkubovanými s TGF-β. Reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení jsou prezentovány v 1000-násobném zvětšení. siRNA; small interfering RNA; TGF-β, transformující růstový faktor beta; p-Smad2/3, fosforylované Smad2 a Smad3 proteiny; PAI-1, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1; NS, nesignifikantní



Obr. 20: Inhibice S100A4 pomocí siRNA tlumí stimulační účinky TGF-β na produkci kolagenu

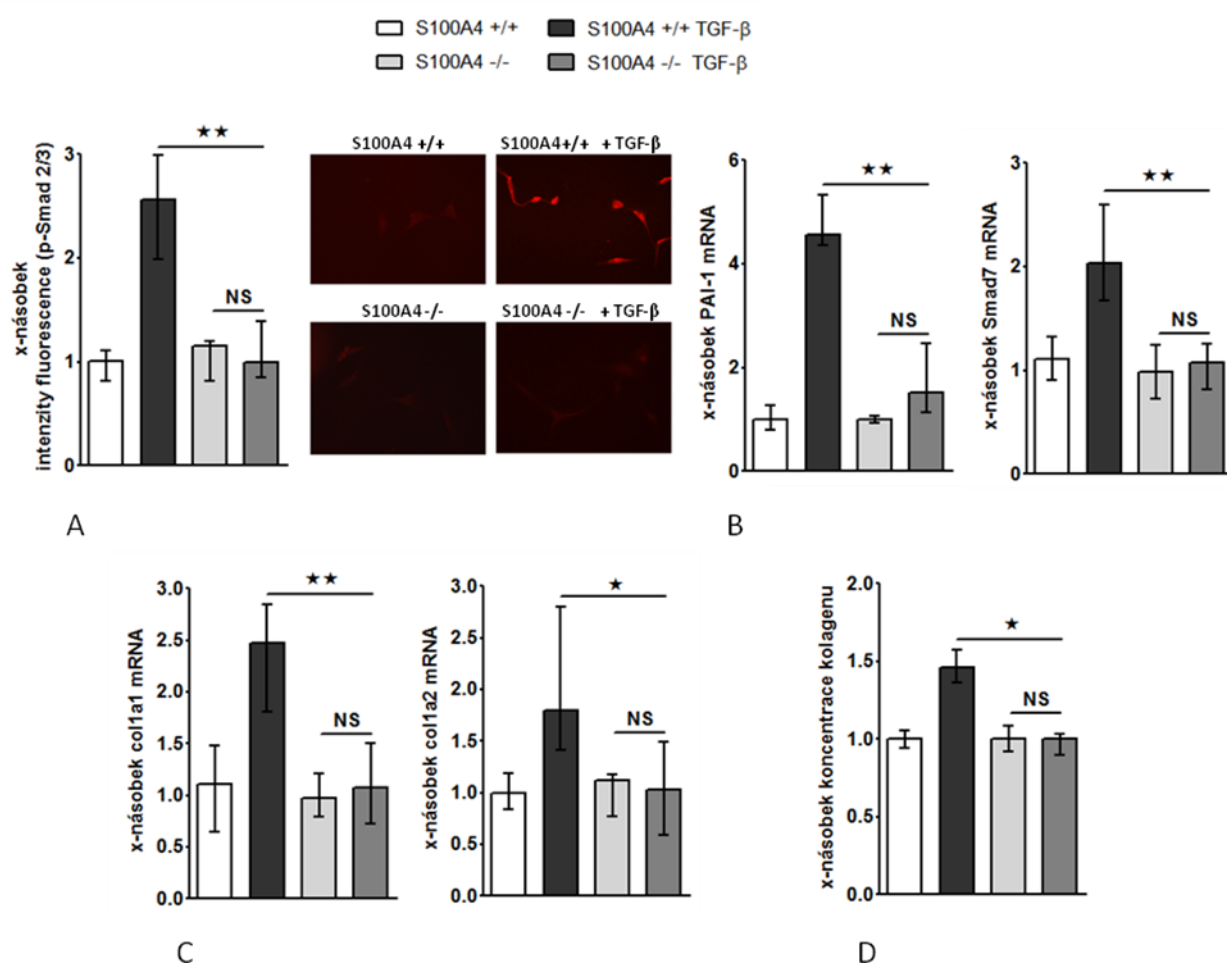
Snížená exprese S100A4 ve fibroblastech transfekovaných s S100A4 siRNA utlumila stimulační účinky TGF-β na luciferázovou aktivitu reporteru pro promotor kolagenu 1a2 (A) (n = 9), na transkripci genů pro kolagen 1a1 a 1a2 (B pro oba) (n = 6 pro oba) a na produkci kolagenu do supernatantu (C) (n = 4) ve srovnání s fibroblasty transfekovanými s kontrolní siRNA inkubovanými s TGF-β.

siRNA; small interfering RNA; TGF-β, transformující růstový faktor beta; col1a2, kolagen 1a2; col1a1, kolagen 1a1; NS, nesignifikantní

(II) Ve druhém přístupu jsme k zhodnocení účinků kompletního deficitu S100A4 na aktivaci TGF-β / Smad signální kaskády a produkci kolagenu použili fibroblasty izolované z kůže S100A4 knock-out myši (S100A4^{-/-}). Jako kontrolu jsme použili fibroblasty izolované z kůže S100A4 wild-type myši (S100A4^{+/+}). Jednotlivé skupiny fibroblastů jsme pak inkubovali s TGF-β a sledovali efekt deficitu S100A4. K analýze ovlivnění TGF-β / Smad signální kaskády jsme použili metod imunofluorescence pro detekci p-Smad2/3 a RT-PCR pro analýzu transkripce klasických TGF-β / Smad indukovatelných genů, PAI-1 a Smad7. K zhodnocení produkce kolagenu jsme použili RT-PCR pro analýzu mRNA exprese kolagenů 1a1 a 1a2 a SirCol esej pro stanovení koncentrace kolagenu produkovaného do supernatantů buněk.

Deficit S100A4 neovlivnil signifikantně expresi TGF-β / Smad indukovatelných genů ani nesnížil bazální sekreci kolagenu v klidových, t.j. nestimulovaných, S100A4^{-/-} fibroblastech (obr. 21B-D). Avšak obdobně jako u snížení exprese S100A4 pomocí siRNA i kompletní deficit S100A4 u S100A4^{-/-} fibroblastů vedl k utlumení stimulačních účinků TGF-β na aktivaci Smad signální kaskády a produkci kolagenu. Ve srovnání s S100A4^{+/+} fibroblasty, u kterých vedla stimulace pomocí TGF-β k očekávané indukci všech sledovaných parametrů, byly S100A4^{-/-} fibroblasty uchráněny od stimulačních účinků TGF-β a nedošlo u nich: k signifikantnímu zvýšení exprese p-Smad2/3 (nárůst o 147 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 2 % u S100A4^{-/-}, p = 0,0021) (obr. 21A) či k indukci mRNA exprese typických TGF-β / Smad

indukovatelných genů PAI-1 (nárůst o 375 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 25 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0095$) a Smad7 (nárůst o 106 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 4 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0022$) (obr. 21B pro oba). V souladu s inhibicí TGF- β / Smad signální kaskády u stimulovaných S100A4^{-/-} fibroblastů nedošlo: k signifikantní indukci mRNA exprese kolagenu 1a1 (nárůst o 137 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 7 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0095$) a kolagenu 1a2 (nárůst o 100 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 3 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0466$) (obr. 21C pro oba) či ke zvýšení produkce kolagenu do supernatantu (nárůst o 47 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 0 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0159$) (obr. 21D).



Obr. 21: Deficit S100A4 u S100A4^{-/-} fibroblastů tlumí profibrotické účinky TGF- β

Deficit S100A4 v S100A4^{-/-} fibroblastech utlumil stimulační účinky TGF- β na akumulaci fosforylovaných Smad2 a Smad3 proteinů (červená fluorescence) (**A**) ($n = 4$), na transkripci typických TGF- β / Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 (**B** pro oba) ($n = 6$ pro oba), na indukci mRNA exprese pro kolagen 1a1 a 1a2 (**C** pro oba) ($n = 6$ pro oba), či na produkci kolagenu do supernatantů buněk (**D**) ($n = 4$) ve srovnání s kontrolními S100A4^{+/+} fibroblasty inkubovanými s TGF- β . Reprezentativní obrázky imunofluorescenčního barvení jsou prezentovány v 1000-násobném zvětšení.

S100A4^{+/+}, fibroblasty s normální expresí S100A4 izolované z S100A4 wild-type myši; S100A4^{-/-}, fibroblasty s deficitem S100A4 izolované z S100A4 knock-out myši; TGF- β , transformující růstový faktor beta; p-Smad2/3, fosforylované Smad2 a Smad3 proteiny; PAI-1, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1; col1a2, kolagen 1a2; col1a1, kolagen 1a1; NS, nesignifikantní

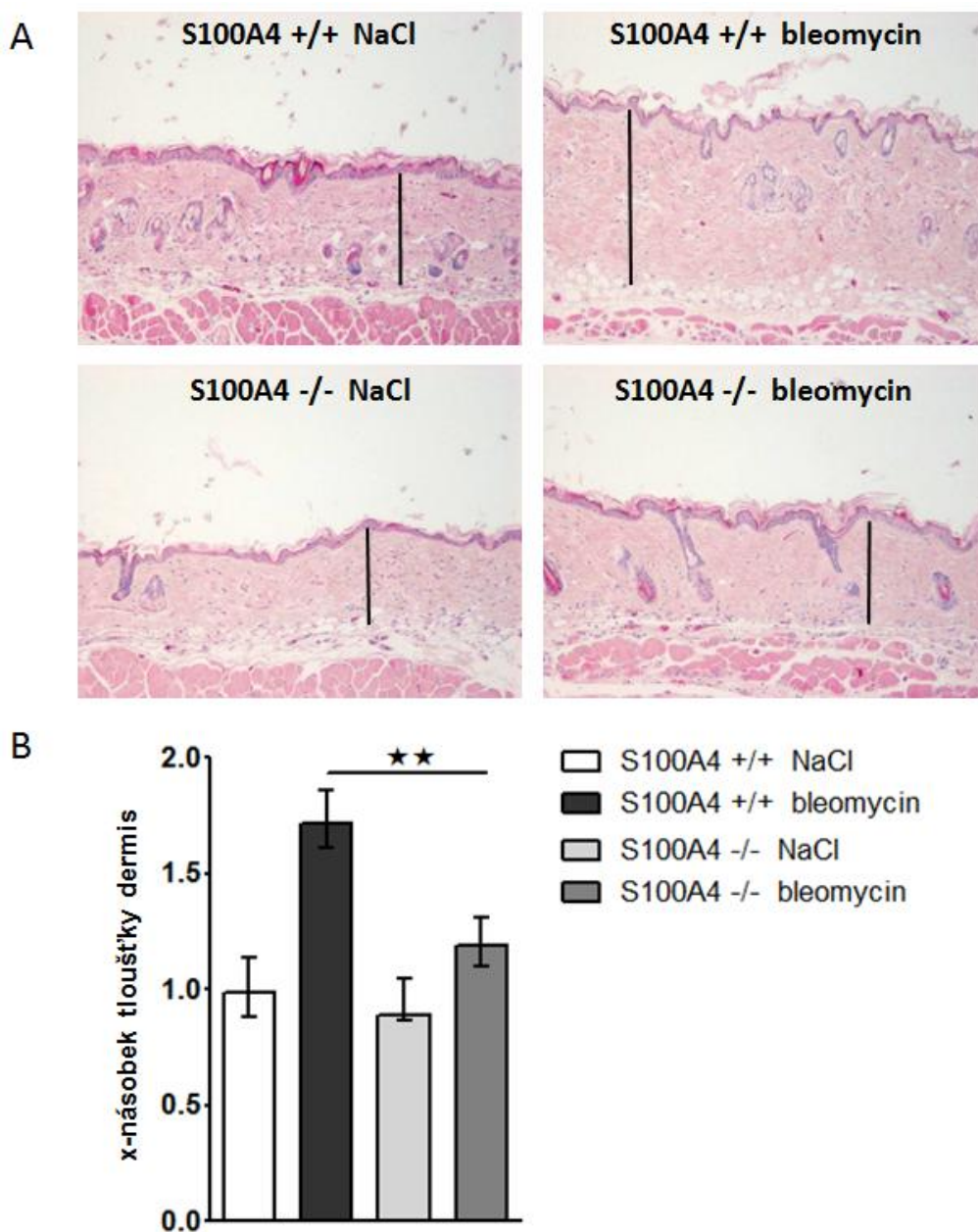
Výsledky obou přístupů demonstrují, že S100A4 je důležitým mediátorem profibrotických účinků TGF- β vedoucích k aktivaci Smad signální dráhy a zvýšené produkci kolagenu a že inaktivace S100A4 má potentní antifibrotické účinky *in vitro*.

4.5 S100A4 knock-out myši jsou chráněny před rozvojem kožní fibrózy indukované bleomycinem

Poté, co jsme prokázali výrazné antifibrotické účinky jak kompletního deficitu S100A4, tak i jeho inhibice *in vitro*, měli jsme za cíl zhodnotit roli S100A4 v aktivaci fibroblastů *in vivo*. Pro tyto účely jsme použili S100A4 knock-out myši (S100A4^{-/-}), u kterých jsme indukovali experimentální kožní fibrózu pomocí subkutánních injekcí bleomycinu. Model bleomycinem indukované kožní fibrózy slouží jako experimentální model napodobující časnou, zánětlivou fázi SSc, ve které jsou fibroblasty aktivovány zejména profibrotickými mediátory uvolněnými z infiltrujících leukocytů (Beyer C. et al., 2010). Indukce kožní fibrózy u S100A4^{-/-} myši byla srovnána s rozvojem fibrózy u S100A4 wild-type myši (S100A4^{+/+}), které mají normální expresi S100A4 ve tkáních. Jako kontrolní agens sloužil fyziologický roztok (NaCl), jenž byl subkutánně aplikován kontrolním skupinám S100A4^{+/+} a S100A4^{-/-} myši. Rozvoj kožní fibrózy byl zhodnocen pomocí měření tloušťky dermis, stanovením koncentrace hydroxyprolinu v kůži hydroxyprolinovou esejí, analýzou počtu myofibroblastů pomocí imunohistochemie, stanovením exprese p-Smad2/3 pomocí metod imunofluorescence a analýzou mRNA exprese TGF- β / Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 v kůži myši pomocí RT-PCR.

Opakované subkutánní aplikace bleomycinu vedly u S100A4 wild-type myši k očekávané indukci kožní fibrózy charakterizované ztlustěním dermis, masivní proliferací myofibroblastů a zvýšeným ukládáním složek ECM. Profibrotické účinky subkutánních aplikací bleomycinu byly zprostředkovány aktivací TGF- β / Smad signální dráhy s indukcí transkripce typických Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 (obr. 22-25). Avšak S100A4 knock-out myši byly uchráněny před rozvojem kožní fibrózy indukované bleomycinem. Ve srovnání s S100A4^{+/+} myši došlo po opakované aplikaci bleomycinu u S100A4^{-/-} myši: k signifikantní redukci ztlustění dermis (nárůst o 72 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 19 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0022$) (obr. 22A a B), k redukci obsahu hydroxyprolinu v kůži (nárůst o 54 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 4 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0011$) (obr. 23A a B) a ke snížení počtu myofibroblastů v kůži (nárůst o 279 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 24 % u S100A4^{-/-}, $p =$

0,0010) (obr. 24A a B). Podobně jako u našich *in vitro* experimentů, jsme i u S100A4^{-/-} myši s aplikací bleomycinu prokázali utlumení aktivace TGF- β / Smad signální kaskády s redukovanou akumulací p-Smad2/3 (nárůst o 263 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 8 % u S100A4^{-/-}, $p < 0,0001$) (obr. 25A) a utlumením indukce mRNA exprese typických Smad indukovatelných genů PAI-1 (nárůst o 254 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 24 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0064$) a Smad 7 (nárůst o 143 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 14 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0080$) (obr. 25B pro oba). Je důležité zdůraznit, že deficit S100A4 u S100A4 knock-out myši nevedl k signifikantnímu snížení bazální úrovně sledovaných parametrů při kontrolní aplikaci NaCl (obr. 22-25).

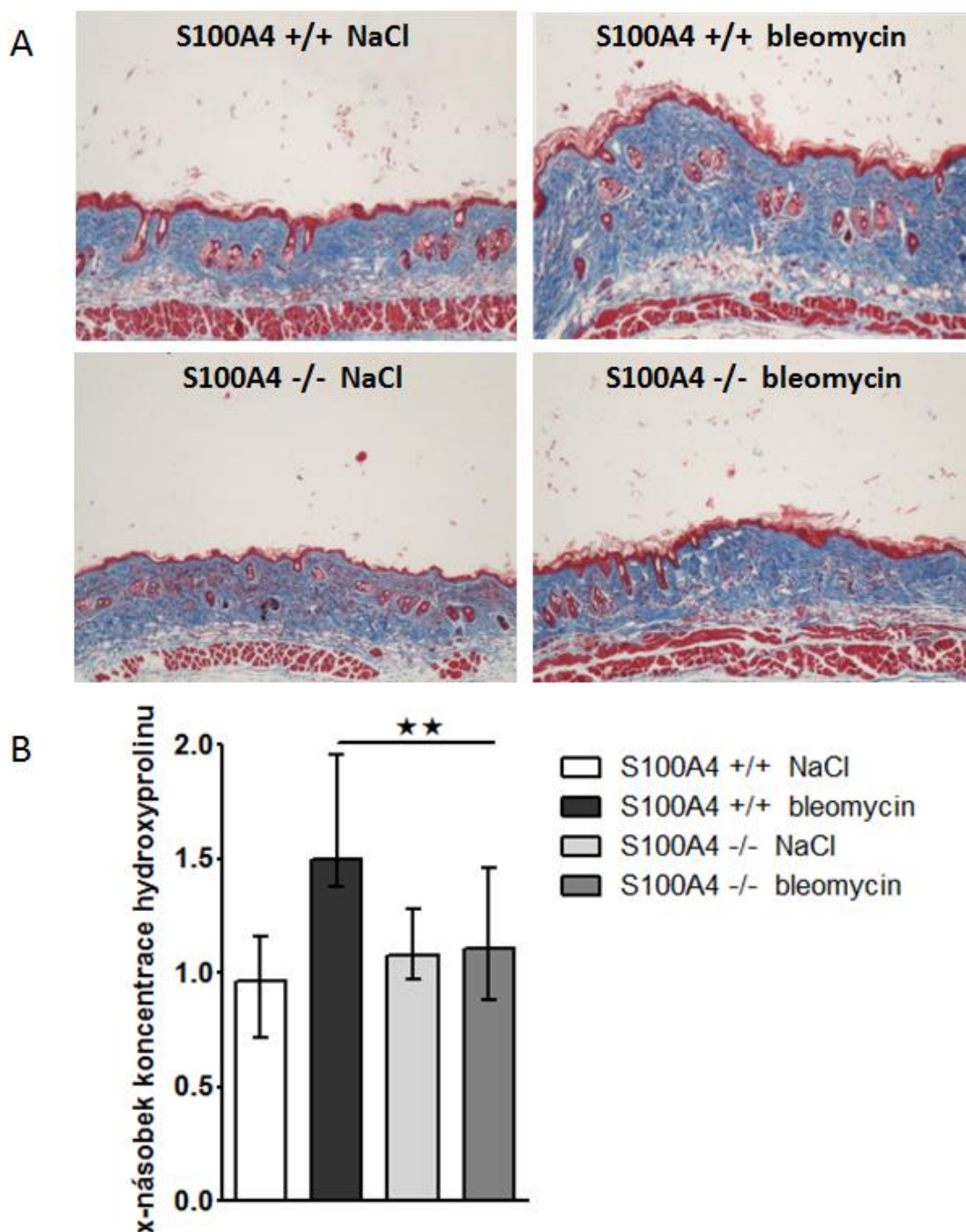


Obr. 22: Deficit S100A4 brání ztlustění dermis v modelu kožní fibrózy indukované bleomycinem

A: Reprezentativní obrázky kožních řezů barvené hematoxylinem-eosinem v 100-násobném zvětšení s černou linií demonstrující tloušťku dermis.

B: U S100A4 knock-out myši vedly subkutánní injekce bleomycinu k menšímu ztlustění dermis než u S100A4 wild-type myši ve srovnání s kontrolní subkutánní aplikací fyziologického roztoku (n = 9 pro S100A4^{+/+} NaCl, n = 6 pro S100A4^{+/+} bleomycin, n = 7 pro S100A4^{-/-} NaCl, n = 6 pro S100A4^{-/-} bleomycin).

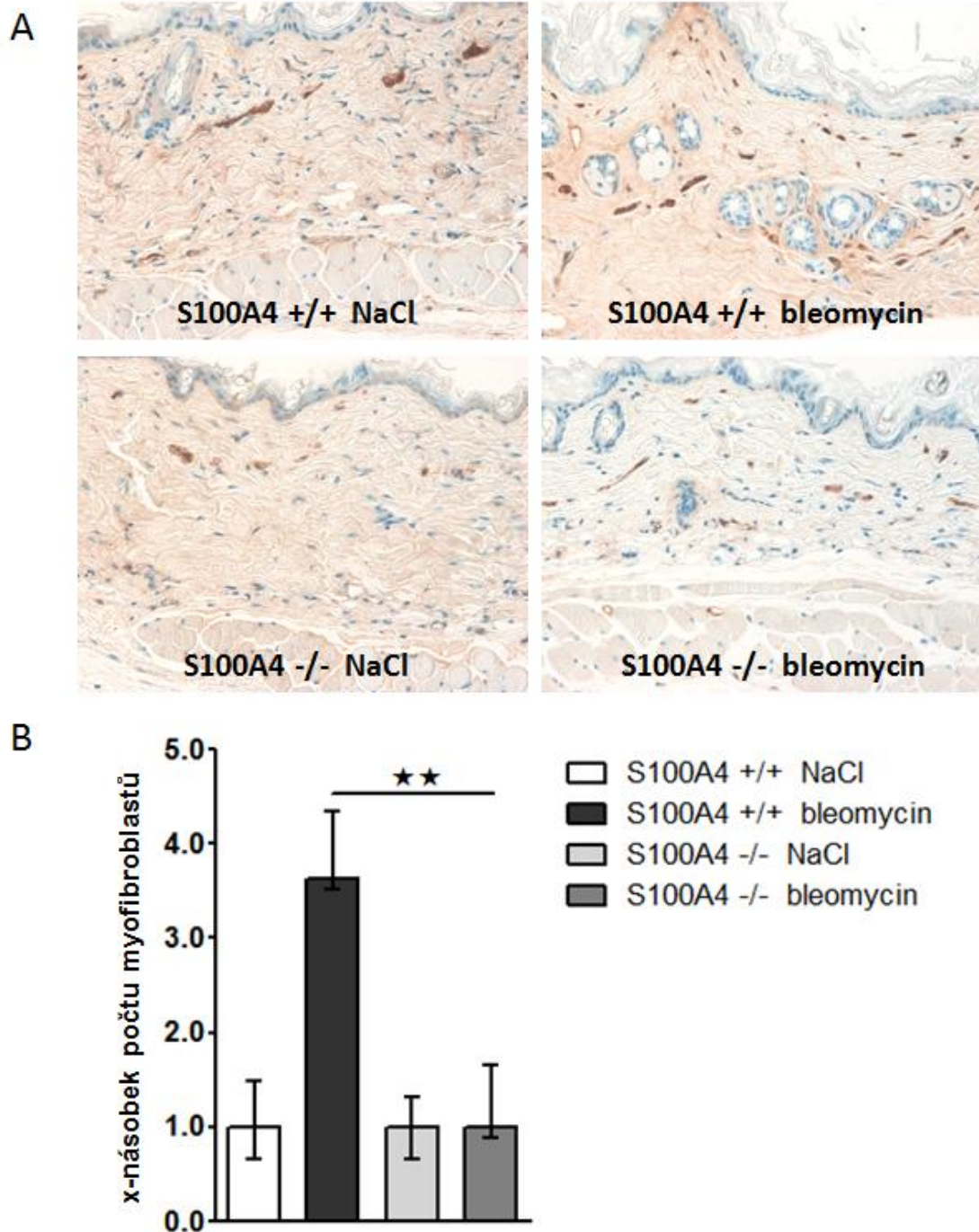
S100A4^{+/+}, myši s normální expresí S100A4; S100A4^{-/-}, myši s deficitem S100A4; NaCl, fyziologický roztok



Obr. 23: Deficit S100A4 brání zvýšené produkci kolagenu v kůži indukované bleomycinem

A: Reprezentativní obrázky kožních řezů barvené modrým Masson trichromem v 100-násobném zvětšení s modře se barvicím kolagenem.

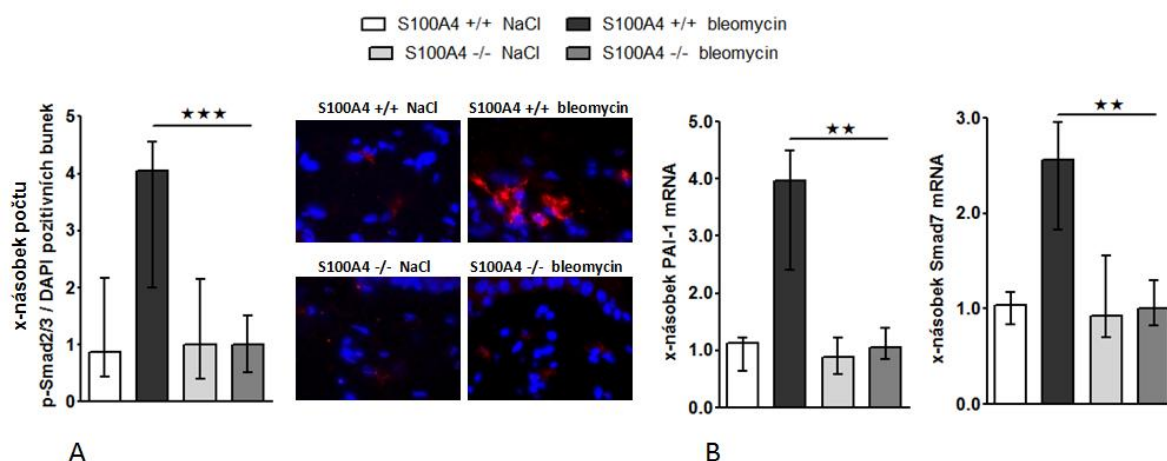
B: U S100A4 knock-out myši vedly subkutánní injekce bleomycinu k nižší produkci kolagenu v kůži než u S100A4 wild-type myši ve srovnání s kontrolní subkutánní aplikací fyziologického roztoku. Obsah kolagenu v kůži myši byl stanoven hydroxyprolinovou esejí a je prezentován jako koncentrace hydroxyprolinu (n = 9 pro S100A4^{+/+} NaCl, n = 6 pro S100A4^{+/+} bleomycin, n = 7 pro S100A4^{-/-} NaCl, n = 6 pro S100A4^{-/-} bleomycin). S100A4^{+/+}, myši s normální expresí S100A4; S100A4^{-/-}, myši s deficitem S100A4; NaCl, fyziologický roztok



Obr. 24: Deficit S100A4 brání masivní proliferaci myofibroblastů v kůži indukované bleomycinem

A: Reprezentativní obrázky kožních řezů zobrazující myofibroblasty (hnědé barvení na α -SMA, marker myofibroblastů) s dobarvenými jádry pomocí hematoxylinu (modrá) ve 200-násobném zvětšení.

B: U S100A4 knock-out myši vedly subkutánní injekce bleomycinu k menší proliferaci myofibroblastů v kůži než u S100A4 wild-type myši ve srovnání s kontrolní subkutánní aplikací fyziologického roztoku. (n = 9 pro S100A4^{+/+} NaCl, n = 6 pro S100A4^{+/+} bleomycin, n = 7 pro S100A4^{-/-} NaCl, n = 6 pro S100A4^{-/-} bleomycin). S100A4^{+/+}, myši s normální expresí S100A4; S100A4^{-/-}, myši s deficitem S100A4; NaCl, fyziologický roztok; α -SMA, α -smooth muscle actin



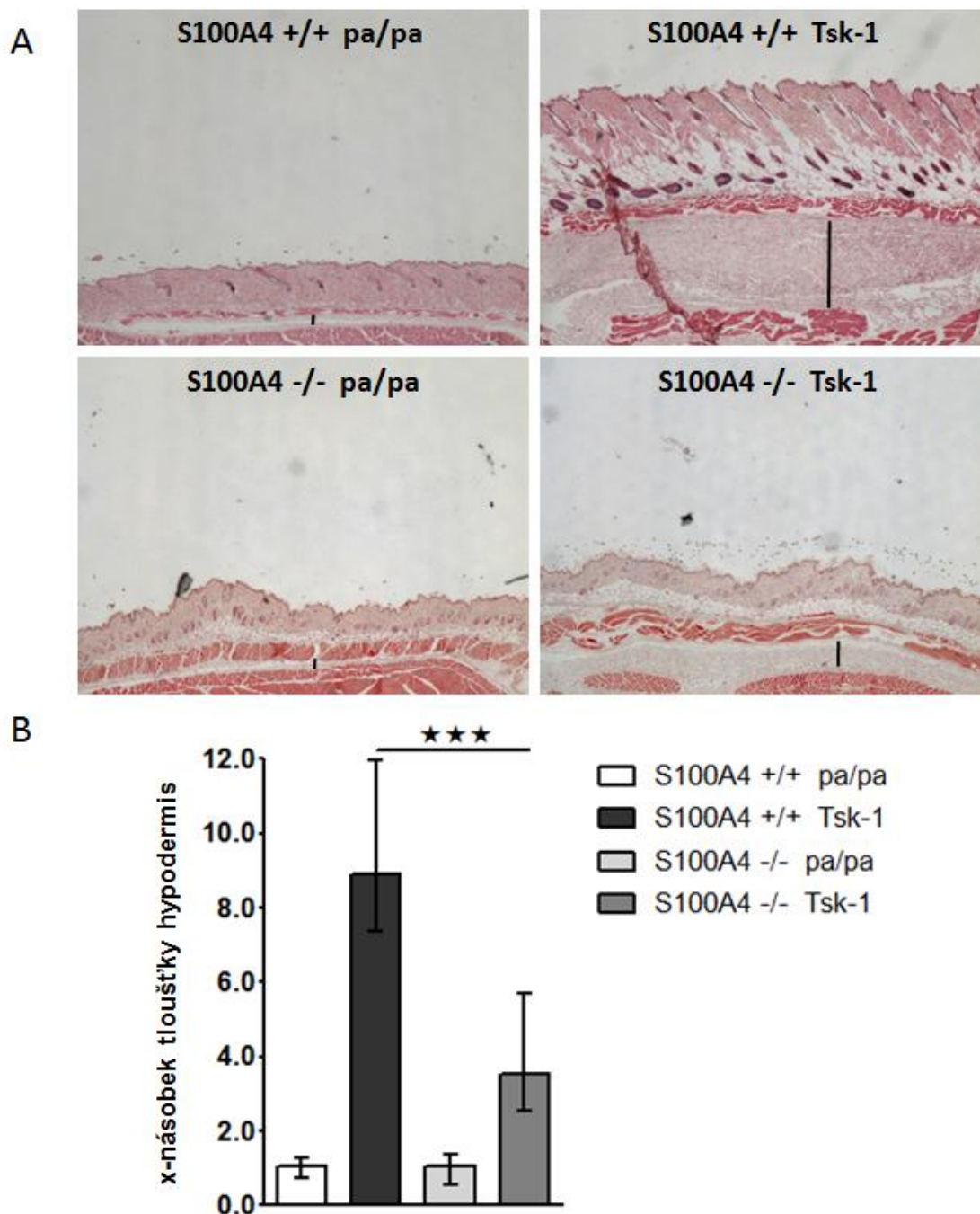
Obr. 25: Deficit S100A4 brání aktivaci Smad signální kaskády v kůži indukované bleomycinem

U S100A4 knock-out myši vedly subkutánní injekce bleomycinu k nižší akumulaci fosforylovaných Smad2 a Smad3 proteinů (A) a k utlumení indukce mRNA exprese typických Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 (B pro oba) než u S100A4 wild-type myši ve srovnání s kontrolní subkutánní aplikací fyziologického roztoku. Reprezentativní obrázky kožních řezů zobrazující expresi p-Smad2/3 (červená fluorescence) a jádra dobarvená pomocí DAPI (modrá fluorescence) jsou prezentovány ve 400-násobném zvětšení (A) (n = 9 pro S100A4^{+/+} NaCl, n = 6 pro S100A4^{+/+} bleomycin, n = 7 pro S100A4^{-/-} NaCl, n = 6 pro S100A4^{-/-} bleomycin). S100A4^{+/+}, myši s normální expresí S100A4; S100A4^{-/-}, myši s deficitem S100A4; NaCl, fyziologický roztok; p-Smad2/3, fosforylované Smad2 a Smad3 proteiny; DAPI, 4',6-diamidin-2-fenylindol; PAI-1, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1

4.6 Deficit S100A4 brání rozvoji fibrózy u Tsk-1 myši

Abychom mohli potvrdit antifibrotické účinky deficitu S100A4 v dalším modelu experimentální kožní fibrózy, použili jsme model Tight skin-1 myši. Na rozdíl od modelu bleomycinem indukované kožní fibrózy jsou Tsk-1 myši méně zánětlivým modelem, který napodobuje pozdější nezápřetlivou fázi SSc, kdy již došlo k ústupu zánětlivé infiltrace tkání a fibroblasty již jsou endogenně aktivované (Beyer C. et al., 2010). Pro tyto účely jsme křížili S100A4 knock-out (S100A4^{-/-}) a wild-type (S100A4^{+/+}) myši s myšmi nesoucími mutaci Tsk-1 (Tsk-1) a kontrolními myšmi, které tuto mutaci nenesou (pa/pa). Indukce kožní fibrózy u S100A4^{-/-} Tsk-1 myši byla srovnána s rozvojem fibrózy u S100A4^{+/+} Tsk-1 myši, které mají normální expresi S100A4 ve tkáních. Jako kontrolní skupiny sloužily myši nenesoucí mutaci Tsk-1, tj. S100A4^{+/+} pa/pa a S100A4^{-/-} pa/pa. Rozvoj kožní fibrózy byl zhodnocen pomocí měření tloušťky hypodermis, jejíž ztlustění je pro Tsk-1 myši typické, dále pomocí stanovení koncentrace hydroxyprolinu, analýzou počtu myofibroblastů pomocí imunohistochemie, stanovením exprese p-Smad2/3 pomocí metod imunofluorescence a mRNA exprese TGF-β / Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 pomocí RT-PCR.

Přítomnost mutace Tsk-1 vedla u S100A4 wild-type myši k očekávané indukci kožní fibrózy charakterizované ztluštěním hypodermis, masivní proliferací myofibroblastů a zvýšeným ukládáním složek ECM. Profibrotické účinky Tsk-1 mutace byly zprostředkovány aktivací TGF- β / Smad signální dráhy s indukcí transkripce typických Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 (obr. 26-29). Avšak S100A4 knock-out myši byly uchráněny před rozvojem kožní fibrózy indukované mutací Tsk-1. Ve srovnání s S100A4^{+/+} Tsk-1 myši došlo u S100A4^{-/-} Tsk-1 myši: k signifikantní redukci ztluštění hypodermis (nárůst o 804 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 271 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0006$) (obr. 26A a B), k redukci obsahu hydroxyprolinu v kůži (nárůst o 71 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 12 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0017$) (obr. 27A a B) a ke snížení počtu myofibroblastů v kůži (nárůst o 298 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 103 % u S100A4^{-/-}, $p < 0,0001$) (obr. 28A a B). Podobně jako u našich *in vitro* experimentů, jsme i u S100A4^{-/-} Tsk-1 myši prokázali utlumení aktivace TGF- β / Smad signální kaskády s redukovanou akumulací p-Smad2/3 (nárůst o 252 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 62 % u S100A4^{-/-}, $p < 0,0001$) (obr. 29A) a utlumením indukce mRNA exprese typických Smad indukovatelných genů PAI-1 (nárůst o 132 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 13 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0179$) a Smad 7 (nárůst o 117 % u S100A4^{+/+} vs. nárůst o 4 % u S100A4^{-/-}, $p = 0,0149$) (obr. 29B pro oba). Je důležité zdůraznit, že deficit S100A4 u S100A4 knock-out myši nevedl k signifikantnímu snížení bazální úrovně sledovaných parametrů u kontrolních pa/pa myši nenesoucích mutaci Tsk-1 (obr. 26-29).

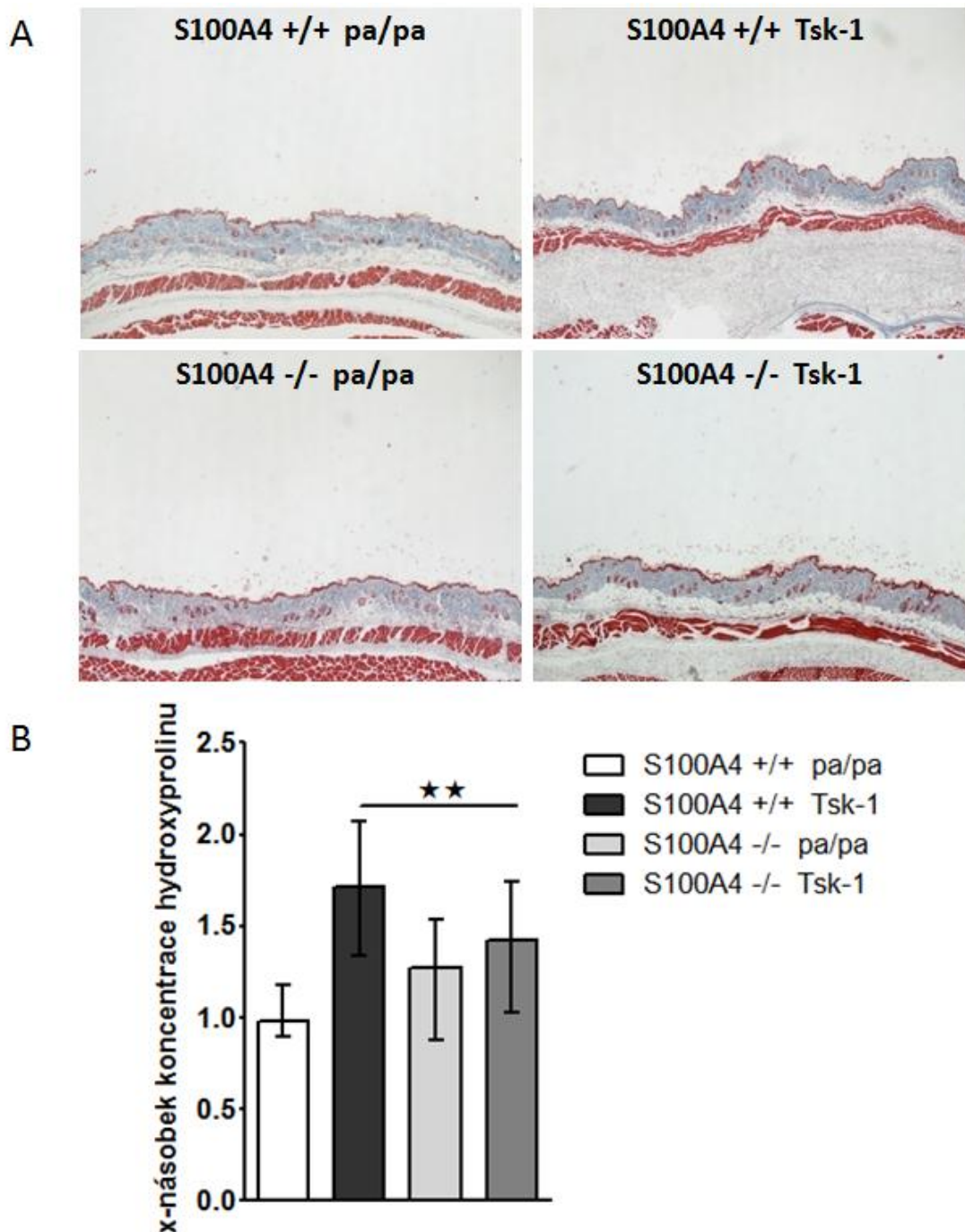


Obr. 26: Deficit S100A4 brání ztlustění hypodermis u Tsk-1 myši

A: Reprezentativní obrázky kožních řezů barvené hematoxylinem-eosinem ve 40-násobném zvětšení s černou linií demonstrující tloušťku hypodermis.

B: U S100A4 knock-out myši s mutací Tsk-1 došlo k menšímu ztlustění hypodermis než u S100A4 wild-type myši s Tsk-1 mutací ve srovnání s kontrolními skupinami pa/pa myši, které nenesou mutaci Tsk-1 (n = 10 pro S100A4^{+/+} pa/pa, n = 8 pro S100A4^{+/+} Tsk-1, n = 10 pro S100A4^{-/-} pa/pa, n = 11 pro S100A4^{-/-} Tsk-1).

S100A4^{+/+}, myši s normální expresí S100A4; S100A4^{-/-}, myši s deficitem S100A4; Tsk-1, Tight skin-1 myši; pa/pa, kontrolní myši nenesoucí mutaci Tsk-1

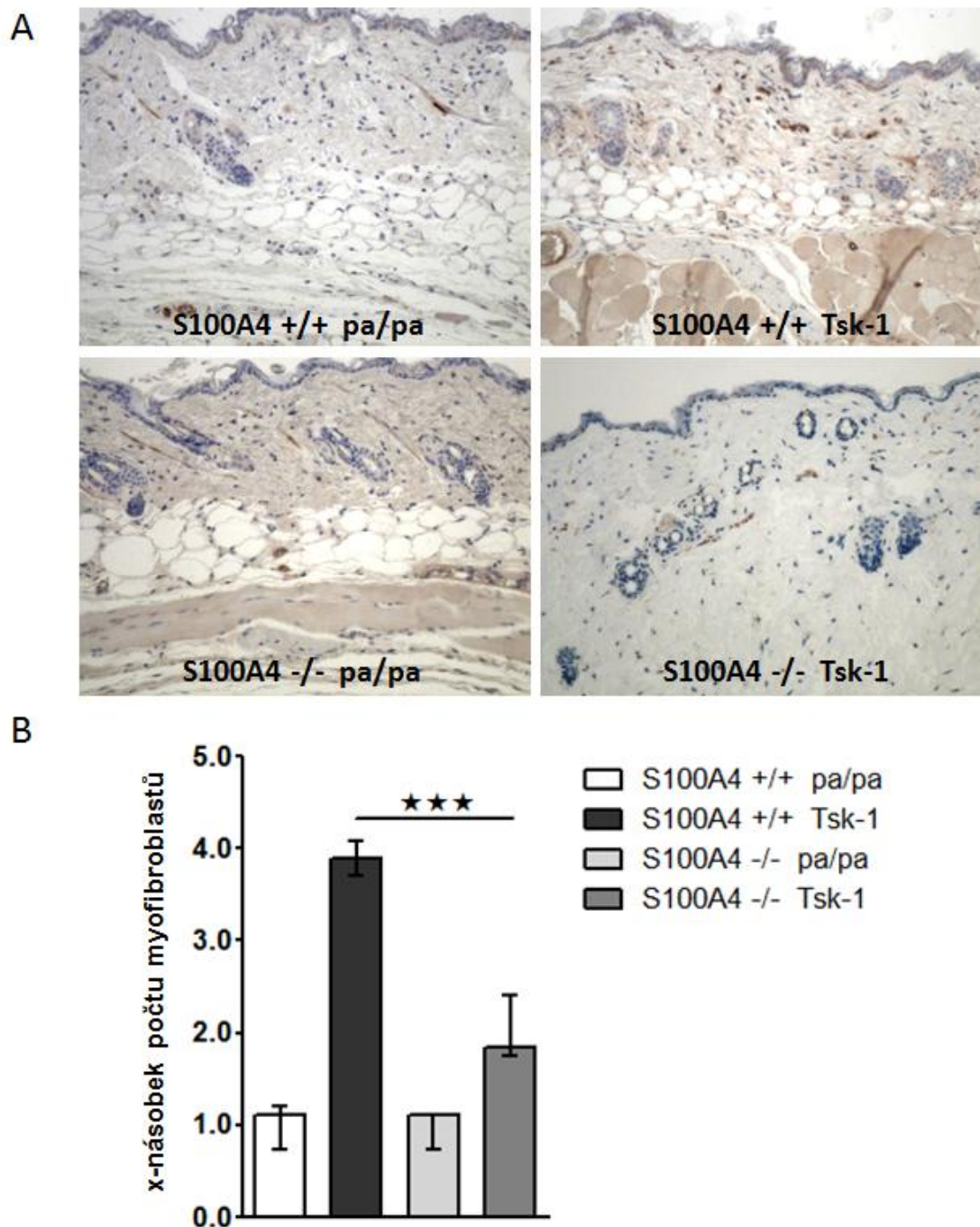


Obr. 27: Deficit S100A4 brání zvýšené produkci kolagenu v kůži Tsk-1 myši

A: Reprezentativní obrázky kožních řezů barvené modrým Masson trichromem ve 40-násobném zvětšení s modře se barvícím kolagenem.

B: U S100A4 knock-out myši s mutací Tsk-1 došlo k nižší produkci kolagenu v kůži než u S100A4 wild-type myši s Tsk-1 mutací ve srovnání s kontrolními skupinami pa/pa myši, které nenesou mutaci Tsk-1. Obsah kolagenu v myši kůži byl stanoven hydroxyprolinovou esejí a je prezentován jako koncentrace hydroxyprolinu (n = 10 pro S100A4^{+/+} pa/pa, n = 8 pro S100A4^{+/+} Tsk-1, n = 10 pro S100A4^{-/-} pa/pa, n = 11 pro S100A4^{-/-} Tsk-1).

S100A4^{+/+}, myši s normální expresí S100A4; S100A4^{-/-}, myši s deficitem S100A4; Tsk-1, Tight skin-1 myši; pa/pa, kontrolní myši nenesoucí mutaci Tsk-1

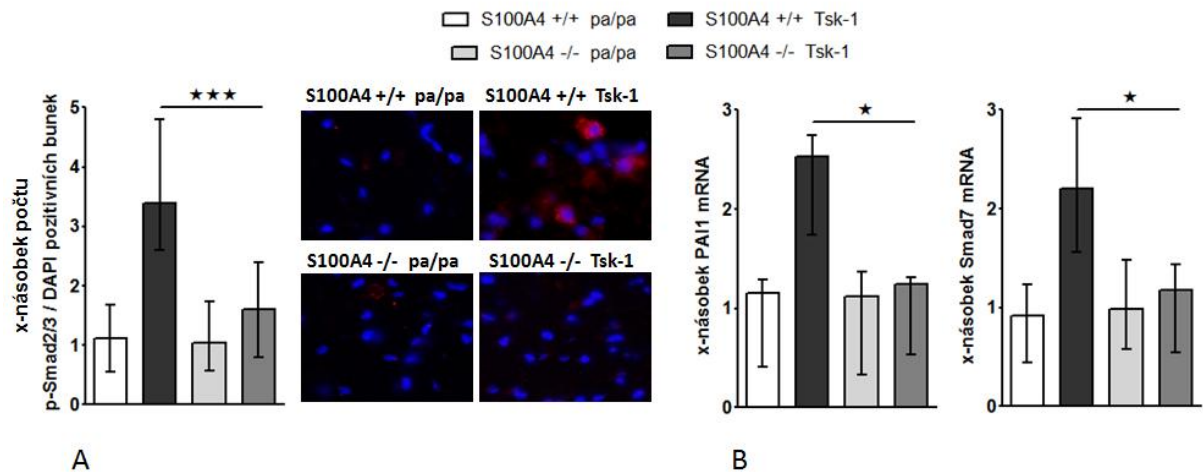


Obr. 28: Deficit S100A4 brání masivní proliferaci myofibroblastů v kůži Tsk-1 myši

A: Reprezentativní obrázky kožních řezů zobrazující myofibroblasty (hnědé barvení na α -SMA, marker myofibroblastů) s dobarvenými jádry pomocí hematoxylinu (modrá) ve 200-násobném zvětšení.

B: U S100A4 knock-out myši s mutací Tsk-1 došlo k menší proliferaci myofibroblastů než u S100A4 wild-type myši s Tsk-1 mutací ve srovnání s kontrolními skupinami pa/pa myši, které nenesou mutaci Tsk-1 (n = 10 pro S100A4^{+/+} pa/pa, n = 8 pro S100A4^{+/+} Tsk-1, n = 10 pro S100A4^{-/-} pa/pa, n = 11 pro S100A4^{-/-} Tsk-1).

S100A4^{+/+}, myši s normální expresí S100A4; S100A4^{-/-}, myši s deficitem S100A4; Tsk-1, Tight skin-1 myši; pa/pa, kontrolní myši nenesoucí mutaci Tsk-1; α -SMA, α -smooth muscle actin



Obr. 29: Deficit S100A4 brání aktivaci Smad signální kaskády v kůži Tsk-1 myši

U S100A4 knock-out myši nesoucích mutaci Tsk-1 došlo k nižší akumulaci fosforylovaných Smad2 a Smad3 proteinů (**A**) a k utlumení indukce mRNA exprese typických Smad indukovatelných genů PAI-1 a Smad7 (**B** pro oba) než u S100A4 wild-type myši nesoucích Tsk-1 mutaci ve srovnání s kontrolními skupinami pa/pa myši, které nenesou mutaci Tsk-1. Reprezentativní obrázky kožních řezů zobrazující expresi p-Smad2/3 (červená fluorescence) a jádra dobarvená pomocí DAPI (modrá fluorescence) jsou prezentovány ve 400-násobném zvětšení (**A**). (n = 10 pro S100A4^{+/+} pa/pa, n = 8 pro S100A4^{+/+} Tsk-1, n = 10 pro S100A4^{-/-} pa/pa, n = 11 pro S100A4^{-/-} Tsk-1).

S100A4^{+/+}, myši s normální expresí S100A4; S100A4^{-/-}, myši s deficitem S100A4; Tsk-1, Tight skin-1 myši; pa/pa, kontrolní myši nenesoucí mutaci Tsk-1; p-Smad2/3, fosforylované Smad2 a Smad3 proteiny; DAPI, 4',6'-diamidin-2-fenylindol; PAI-1, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1

5 DISKUSE

V naší práci o roli S100A4 proteinu v patogenezi systémové sklerodermie demonstrujeme jako první, že exprese S100A4 proteinu je zvýšená v postižené kůži pacientů se SSc, v kultivovaných SSc fibroblastech a ve dvou různých modelech experimentální kožní fibrózy. Ve srovnání s kůží zdravých jedinců byla exprese S100A4 výrazně zvýšená ve fibrotické kůži, zejména ve fibroblastech a aktivovaných fibroblastech – tzv. myofibroblastech papilární vrstvy dermis. Naše výsledky demonstrují na několika úrovních experimentů *in vitro* a *in vivo*, že zvýšená exprese S100A4 je zprostředkována kanonickou signální kaskádou TGF- β : (I) Exprese S100A4 v kůži pacientů se SSc kolokalizovala s expresí p-Smad2/3, centrálních mediátorů TGF- β signální kaskády. (II) Inkubace kultivovaných zdravých dermálních fibroblastů s rekombinantním TGF- β zvýšila expresi S100A4 na úrovni mRNA i na proteinové úrovni. (III) Snížení exprese Smad3 pomocí siRNA kompletně utlumilo stimulační účinky TGF- β na expresi S100A4 na úrovni mRNA i na proteinové úrovni. (IV) Zvýšená exprese S100A4 byla zachována v kultivovaných fibroblastech izolovaných z postižené kůže pacientů se SSc ve srovnání se zdravými dermálními fibroblasty i po několika pasážích ve tkáňových kulturách, což je v souladu s endogenní aktivací TGF- β signální kaskády v kultivovaných SSc fibroblastech (LeRoy E., 1974). Stimulační účinky TGF- β na expresi S100A4 však nejsou omezeny jen na fibroblasty. TGF- β rovněž indukuje expresi S100A4 i v epiteliálních buňkách - jako je tomu u buněk endometriálních nádorů (Xie R. et al., 2009) či u multipotentních progenitorových buněk rohovky (Kawakita T. et al., 2013). Výsledky těchto studií taktéž demonstrují, že TGF- β je důležitým regulátorem tvorby S100A4. I další faktory, jako je například hypoxie, mohou rovněž přispívat k regulaci exprese S100A4 u SSc. V postižené kůži pacientů se SSc byl prokázán výrazně snížený parciální tlak kyslíku (Beyer C. et al., 2009; Distler J. et al., 2007) a nedávno bylo prokázáno, že hypoxie indukuje expresi S100A4 (Copple B., 2010).

Naše práce dále demonstruje, že S100A4 může zesílit kanonickou TGF- β signální dráhu u SSc. Exprese S100A4 je nejenom indukovaná pomocí TGF- β , ale rovněž aktivně potencuje TGF- β signální kaskádu ve fibroblastech. Zvýšení exprese S100A4 pomocí expresního plasmidu i stimulace zdravých dermálních fibroblastů pomocí rekombinantního S100A4 proteinu vedou k potentní aktivaci signální dráhy TGF- β i bez přítomnosti exogenního TGF- β . Následně došlo: (a) k indukci nukleární akumulace p-Smad2/3, (b) k aktivaci Smad-dependentí transkripce genů PAI-1 a Smad7 i (c) genů pro kolagen typu I (colla1, colla2) a (d) ke zvýšení produkce kolagenu do supernatantů buněk. Naproti tomu vedla inhibice

exprese S100A4 pomocí siRNA nebo jeho kompletní deficit ve fibroblastech izolovaných z kůže S100A4 knock-out myši k utlumení stimulačních účinků TGF- β na lidské nebo myši dermální fibroblasty - došlo k zamezení: (a) indukce akumulace p-Smad2/3, (b) aktivace transkripce Smad-dependentních genů PAI-1 a Smad7 a (c) genů pro kolagen typu I (colla1, colla2) i (d) zvýšení produkce kolagenu do supernatantů buněk. I když molekulární mechanismy, kterými S100A4 reguluje Smad-dependentní transkripci v SSc fibroblastech, ještě musí být objasněny, výsledky recentně publikované práce u (HEK)-293T (human embryonic kidney) buněk demonstrují, že S100A4 může fyzicky interagovat se Smad proteiny způsobem závislým na vápníku (Matsuura I. et al., 2010). S100A4 tak pravděpodobně může modulovat vazbu Smad proteinů na DNA či interakci mezi Smad proteiny a kofaktory zprostředkující regulaci exprese klasických TGF- β / Smad-dependentních genů (Matsuura I. et al., 2010). Tyto výsledky společně demonstrují důležité regulační účinky S100A4 na kanonickou signální dráhu TGF- β a vedou k závěru, že zvýšená exprese S100A4 může přispívat k aberantní aktivaci TGF- β v patogenezi SSc.

Naše výsledky dále prokázaly, že inaktivace S100A4 má silné antifibrotické účinky. Deficit S100A4 vede k útlumu TGF- β / Smad-dependentní transkripce v kultivovaných fibroblastech a brání aberantní aktivaci kanonické TGF- β signální dráhy v myších modelech SSc. Utlumení signální kaskády TGF- β se přímo odráží v inhibičních účincích na aktivaci fibroblastů a produkci kolagenu typu I do supernatantů buněk. Deficit S100A4 u S100A4 knock-out myši navíc bránil v rozvoji experimentální kožní fibrózy ve dvou různých modelech a vedl k významné redukci ztlustění kůže, k nižší akumulaci kolagenu a k omezení diferenciaci klidových fibroblastů v myofibroblasty. Myši modely, které jsme v této studii použili, napodobují různé aspekty SSc u lidí. Model bleomycinem indukované kožní fibrózy napodobuje časnou – zánětlivou fázi SSc, ve které jsou fibroblasty aktivovány zejména profibrotickými mediátory uvolněnými z leukocytů infiltrujících poškozené tkáně (Beyer C. et al., 2010; Yamamoto T. et al., 1999). Na rozdíl od bleomycinem indukované kožní fibrózy reprezentuje model Tsk-1 myši pozdní fázi SSc, ve které již došlo k vymizení zánětlivé infiltrace a fibroblasty se staly endogenně aktivovanými (Beyer C. et al., 2010; Green M. et al., 1976). Silné antifibrotické účinky inaktivace S100A4 v obou modelech naznačují, že by inhibice S100A4 mohla být účinná jak u podskupin pacientů se SSc, u kterých momentálně dominuje zánětlivá složka patogeneze, tak i u těch, u kterých je již zánět na ústupu a hlavním patomechanismem je fibróza. Inaktivace S100A4 nemusí mít antifibrotické účinky jen v modelech kožní fibrózy, ale i u dalších fibrotických onemocnění jako je například plicní

fibróza nebo fibróza srdce (Lawson W. et al., 2005; Zeisberg E. et al., 2007). Inhibice S100A4 by se tak mohla stát zajímavým cílem nových antifibrotických terapií. Navíc je důležité zmínit, že inaktivace S100A4 neovlivňuje bazální fyziologickou produkci kolagenu u myších modelů experimentální kožní fibrózy, a proto by teoreticky neměla omezit ani normální homeostázu kolagenu u pacientů se SSc. *In vitro* nevedlo utlumení exprese S100A4 pomocí siRNA ani kompletní deficit S100A4 u fibroblastů izolovaných z S100A4 knock-out myši ke snížení bazální produkce kolagenu typu I u klidových, tj. nestimulovaných fibroblastů. *In vivo* měly kontrolní S100A4 knock-out myši podobnou strukturu kůže a vnitřních orgánů a zejména srovnatelné hodnoty obsahu kolagenu v kůži jako S100A4 wild-type myši, které mají normální expresi S100A4 ve tkáních. Další podrobnější studie však budou zapotřebí k objasnění všech účinků inaktivace S100A4 na homeostázu kolagenu ve tkáních *in vivo*.

Prostředků k inaktivaci S100A4 *in vivo* nebylo dosud popsáno mnoho. Zibert a spoluautoři nedávno použili k účinnému potlačení rozvoje experimentální psoriázy u myšního modelu polyklonální protilátky proti S100A4 (Zibert J. et al., 2010). Sack a spoluautoři demonstrovali, že inhibitor transkripce S100A4, kalcimycin, brání formaci metastáz karcinomu tlustého střeva v myším modelu (Sack U. et al., 2011). Kolektiv prof. Grigorian v Institute of Cancer Biology, Danish Cancer Society v Kodani momentálně zkoumá účinnost inhibice S100A4 pomocí monoklonálních protilátek blokujících S100A4 u myších experimentálních modelů různých druhů nádorů s velmi slibnými výsledky (zatím nepublikovaná data). Jelikož je S100A4 bezpochyby velmi atraktivním cílem nových přístupů molekulární terapie hlavně u nádorových onemocnění, četné studie zacílené na zkoumání tohoto proteinu by mohly brzy přispět dalšími možnostmi účinné inaktivace S100A4 *in vivo*.

Výsledky naší analýzy role S100A4 u SSc, která je podkladem mé disertační práce, mohou být dále podpořeny naší další klinicky zaměřenou studií, která je plynulým pokračováním zde prezentovaných dat. Analyzovali jsme koncentraci S100A4 proteinu v sérech pacientů se SSc a zdravých kontrol. Zjistili jsme signifikantně vyšší koncentrace S100A4 u pacientů se SSc ve srovnání se zdravými dárci a dokonce i významně vyšší koncentrace S100A4 u podskupiny pacientů s difúzní formou SSc (dcSSc) oproti podskupině pacientů s limitovanou formou SSc (lcSSc). Koncentrace S100A4 v séru pozitivně korelovaly s modifikovaným Rodnanovým kožním skóre (mRSS), které kvantifikuje rozsah a stupeň ztlustění kůže celého těla. Dále jsme prokázali i signifikantně pozitivní korelaci sérových koncentrací S100A4 se skóre aktivity

nemoci (EULAR SSc disease activity score). Toto skóre je kompozitním indexem několika parametrů zahrnujících postižení kůže, periferních cév, kloubů, plic, srdce a laboratorních parametrů (sedimentace a komplementu C3 a 4) (Valentini G. et al., 2003). Vzhledem k nedostatku vhodných biomarkerů u SSc, které by byly spolehlivým ukazatelem aktivity nemoci nebo úspěšnosti léčby, by se S100A4 mohl stát i potenciálním biomarkerem této komplikované nemoci. Preliminární data této studie však bude nutno nejdříve potvrdit na větším počtu pacientů se SSc a zdravých kontrol.

6 ZÁVĚR

Ve své disertační práci demonstruji, že S100A4 je klíčovým regulátorem aktivace fibroblastů u systémové sklerodermie. Exprese S100A4 je indukovaná pomocí TGF- β a S100A4 zpětně zesiluje profibrotické účinky kanonické TGF- β / Smad signální dráhy. Inaktivace S100A4 účinně tlumí aktivaci fibroblastů indukovanou TGF- β a brání rozvoji experimentální kožní fibrózy u dvou myších modelů SSc. Naše výsledky mají i translační potenciál, protože různé přístupy inaktivace S100A4 jsou momentálně analyzovány *in vivo* u experimentálních modelů nádorových i nenádorových onemocnění.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α -SMA, α -smooth muscle actin

ACA, anticentromerové protilátky

Ad-CAGA-Luc, adenovirový vektor nesoucí sekvenci CAGA charakteristickou pro SBE

Akt/PKB, proteinkináza B

ANA, antinukleární protilátky

anti- α -SMA, protilátky proti α -smooth muscle actin

anti-P4H, protilátky proti prolyl-4-hydraxyláze-beta

anti-p-Smad2/3, protilátky proti fosforylovaným proteinům Smad2 a Smad3

anti-S100A4, protilátky proti S100A4

anti-Scl70, protilátky proti topoisomeráze I

anti-U1 RNP, protilátky vázající se na malý ribonukleoprotein (snRNP)

AP-1, activator protein 1

β -gal, pSv- β -galaktozidázový vektor

BALB/c, nejpoužívanější kmen inbredních albino myši

Bcl2, B-cell lymphoma 2

BMP7, bone morphogenetic protein 7

bp, páry bazí

BSA, bovine serum albumine, hovězí sérový albumin

c-Abl, cytoplasm-Abelson tyrosine kinase

CBF, core binding factor

CBP, CREB-binding protein (CREB, cAMP response element-binding protein)

CCl₄, tetrachlormetan

cDNA, komplementární DNA

CNS, centrální nervový systém

col1a1, kolagen 1a1

col1a2, kolagen 1a2

col1a2 promotor reporter, reporter pro promotor kolagenu 1a2

Cre/loxP, rekombinanční systém (Cre, cyclization recombinase, loxP, locus of X-over P1)

CSML-100, vysoce maligní buněčná linie adenokarcinomu prsu

Ct, cycle threshold, počet cyklů potřebných pro fluorescenční signál na překonání práhu pro hodnoty pozadí

CTGF, connective tissue growth factor, tkáňový pojivový růstový faktor

DAB, 3,3'-diaminobenzidin

DAPI, 4',6-diamidin-2-fenylindol

dcSSc, diffuse cutaneous SSc, difúzní forma systémové sklerodermie

DMARDs, disease modifying antirheumatic drugs, choroby modifikující léky

DMEM/F12, Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA, deoxyribonukleová kyselina

dNTP, deoxyribonukleotidtrifosfát

dsDNA, dvouvláknová DNA

ECM, extracelulární matrix

EGR-1, early growth response 1

Elk-1, ETS-like transcription factor 1 (ETS, E twenty-six)

EMT, epiteliálně-mezenchymální tranzice

ERK1/2, extracellular-signal-regulated kinases

ET-1, endothelin-1

ETS, E twenty-six, rodina transkripčních faktorů

EULAR, The European League Against Rheumatism

EUSTAR, EULAR Scleroderma Trials and Research group

FBS, fetal bovine serum, fetální hovězí sérum

Fra-2, Fra-2 transgenní myši se systémovými příznaky podobnými SSc

GIT, gastrointestinální trakt

GK, glukokortikoidy

H₂O₂, peroxid vodíku

Ha-Ras-ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases

HClO₄, kyselina perchlorová

(HEK)-293T, human embryonic kidney, buněčná linie lidských embryonálních buněk z ledvin

HRP-, horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies, sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou

IgA, imunoglobulin A

IL, interleukin

INF- γ , interferon- γ

IQR, interquartile range, tj. rozdíl mezi 75. a 25. percentilem

JNK, c-Jun N-terminal kinase

kDa, kilodalton

LB, Luria Broth médium

lcSSc, limited cutaneous SSc, limitovaná kožní forma systémové sklerodermie

MAP, mitogen-activated protein

MCP-1, monocyte chemotactic protein-1

MEK, mitogen-activated protein kinase kinase

MHC, hlavní histokompatibilní komplex

MOI, multiplicity of infection, multiplicita infekce

mRNA, messenger RNA, informační/mediátorová RNA

mRSS, modified Rodnan skin score, modifikované Rodnanovo kožní skóre

mts-1, metastatin 1, S100A4

NaCl (0,9 %), fyziologický roztok

no template, kontrolní vzorky bez cDNA

non-RT, kontrolní vzorky cDNA, které byly reverzně transkribovány bez použití reverzní transkriptázy

NS, nesignifikantní

NSA, nesteroidní antirevmatika

OA, osteoartróza

P4H, prolyl 4-hydroxyláza

pa/pa, kontrolní myši nenesoucí mutaci Tsk-1

PAI-1, inhibitor aktivátoru plasminogenu-1

PAK2, p21-activated kinase 2

PBS, phosphate buffered saline

pcDNA3.1, kontrolní plasmid nezvyšující expresi S100A4

pcDNA3.1_S100A4, expresní plasmid zvyšující expresi S100A4

PDGF, platelet derived growth factor, růstový faktor z destiček

PFA, paraformaldehyd

PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase

PNS, periferní nervový systém

p-Smad2/3, fosforylované proteiny Smad2 a Smad3

p-hodnoty, hladiny významnosti

PVDF, polyvinylidendifluorid

RAG-2, recombinase activating gen-2

RAGE, receptor for advanced glycation end-products

ROCK-1, Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 1

RNA, ribonukleová kyselina

RT-PCR, real time PCR, kvantitativní polymerázová řetězová reakce

S100A4^{-/-}, S100A4 knock-out myši, myši s nulovou expresí S100A4 ve tkáních

S100A4^{+/+}, S100A4 wild-type myši, myši s normální expresí S100A4 ve tkáních

SBE, Smad Binding Element, úsek DNA v promotorech genů přímo indukovatelných pomocí TGF- β / Smad signální kaskády s typickou sekvencí CAGA

SclGvHD, chronická sklerodermatózní reakce štěpu proti hostiteli

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza

siRNA, small interfering RNA

Smad, Smad proteiny, homology jak proteinu Drosophily zvaného MAD (mothers against decapentaplegic) tak proteinu Caenorhabditis elegans zvaného SMA (small body size)

SP1, specificity protein 1

SSc, systemic sclerosis, systémová sklerodermie

TAB1/2, TAK1-binding protein 1/2

TAK1, TGF- β activated kinase 1

TBRI^{CA}; Cre-ER, TBRI^{CA}; Cre-ER myši, model postnatální podmíněně zvýšené exprese TGF β RI pomocí tamoxifenem indukovatelného Cre/loxP systému

TGF- β , transforming growth factor beta, transformující růstový faktor beta

TGF β RI, TGF- β receptor I. typu

TGF β RII, TGF- β receptor II. typu

Th, T helper lymfocyt

Tsk-1, Tight skin-1 myši, myši u nichž vede mutace Tsk-1 k rozvoji kožní fibrózy

UCD-200/206, kuřata linie UCD-200 a UCD-206 se systémovými příznaky podobnými SSc

VEGF, vascular endothelial growth factor, vaskulární endoteliální růstový faktor

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Research & Therapy*. 2007;9 Suppl 2:S2.

Abraham DJ, Varga J. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol*. 2005;26(11):587-595.

Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, Christensen C, Kriajevska M, Tulchinsky E, Georgiev G, Berezin V, Bock E, Rygaard J, Cao R, Cao Y, Lukanidin E. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*. 2001;20(34):4685-4695.

Ambartsumian NS, Grigorian MS, Larsen IF, Karlstrom O, Sidenius N, Rygaard J, Georgiev G, Lukanidin E. Metastasis of mammary carcinomas in GRS/A hybrid mice transgenic for the mts1 gene. *Oncogene*. 1996;13(8):1621-1630.

Andersen K, Nesland JM, Holm R, Florenes VA, Fodstad O, Maelandsmo GM. Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2004;17(8):990-997.

Arnett FC, Cho M, Chatterjee S, Aguilar MB, Reveille JD, Mayes MD. Familial occurrence frequencies and relative risks for systemic sclerosis (scleroderma) in three United States cohorts. *Arthritis Rheum*. 2001;44(6):1359-1362.

Artlett CM. Immunology of systemic sclerosis. *Front Biosci*. 2005;10:1707-1719.

Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F, Luchetti M, Spadoni T, Mancini M, Fraticelli P, Sambo P, Funaro A, Kazlauskas A, Avvedimento EV, Gabrielli A. Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(25):2667-2676.

Baxter RM, Crowell TP, McCrann ME, Frew EM, Gardner H. Analysis of the tight skin (Tsk1/+) mouse as a model for testing antifibrotic agents. *Lab Invest*. 2005;85(10):1199-1209.

Belot N, Pochet R, Heizmann CW, Kiss R, Decaestecker C. Extracellular S100A4 stimulates the migration rate of astrocytic tumor cells by modifying the organization of their actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1600(1-2):74-83.

Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum*. 2010;62(10):2831-2844.

Beyer C, Schett G, Gay S, Distler O, Distler JH. Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(2):220.

Bou-Gharios G, Garrett LA, Rossert J, Niederreither K, Eberspaecher H, Smith C, Black C, Crombrughe B. A potent far-upstream enhancer in the mouse pro alpha 2(I) collagen gene regulates expression of reporter genes in transgenic mice. *J Cell Biol*. 1996;134(5):1333-1344.

Boye K, Maeldansmo GM. S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles. *Am J Pathol*. 2010;176(2):528-535.

Boye K, Nesland JM, Sandstad B, Maeldansmo GM, Flatmark K. Nuclear S100A4 is a novel prognostic marker in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(16):2919-2925.

Bruneval P, Rossert J, Bariety J. Renewal of FSP1: a marker of fibrogenesis on human renal biopsies. *Kidney Int*. 2005;68(3):1366-1367.

Carvalho D, Savage CO, Black CM, Pearson JD. IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest*. 1996;97(1):111-119.

Cerezo LA, Kuncova K, Mann H, Tomcik M, Zamecnik J, Lukanidin E, Neidhart M, Gay S, Grigorian M, Vencovsky J, Senolt L. The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(10):1766-1772.

Claman HN, Jaffee BD, Huff JC, Clark RA. Chronic graft-versus-host disease as a model for scleroderma. II. Mast cell depletion with deposition of immunoglobulins in the skin and fibrosis. *Cell Immunol.* 1985;94(1):73-84.

Copple BL. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int.* 2010;30(5):669-682.

Davies BR, O'Donnell M, Durkan GC, Rudland PS, Barraclough R, Neal DE, Mellon JK. Expression of S100A4 protein is associated with metastasis and reduced survival in human bladder cancer. *J Pathol.* 2002;196(3):292-299.

Denton CP, Zheng B, Shiwen X, Zhang Z, Bou-Gharios G, Eberspaecher H, Black CM, de Crombrughe B. Activation of a fibroblast-specific enhancer of the proalpha2(I) collagen gene in tight-skin mice. *Arthritis Rheum.* 2001;44(3):712-722.

Distler JH, Allanore Y, Avouac J, Giacomelli R, Guiducci S, Moritz F, Akhmetshina A, Walker UA, Gabrielli A, Muller-Ladner U, Tyndall A, Matucci-Cerinic M, Distler O. EULAR Scleroderma Trials and Research group statement and recommendations on endothelial precursor cells. *Ann Rheum Dis.* 2009;68(2):163-168.

Distler JH, Jungel A, Huber LC, Schulze-Horsel U, Zwerina J, Gay RE, Michel BA, Hauser T, Schett G, Gay S, Distler O. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(1):311-322.

Distler JH, Jungel A, Pileckyte M, Zwerina J, Michel BA, Gay RE, Kowal-Bielecka O, Matucci-Cerinic M, Schett G, Marti HH, Gay S, Distler O. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(12):4203-4215.

Distler O, Distler JH, Scheid A, Acker T, Hirth A, Rethage J, Michel BA, Gay RE, Muller-Ladner U, Matucci-Cerinic M, Plate KH, Gassmann M, Gay S. Uncontrolled expression of

vascular endothelial growth factor and its receptors leads to insufficient skin angiogenesis in patients with systemic sclerosis. *Circ Res.* 2004;95(1):109-116.

Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech.* 2003;60(6):540-551.

Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, Afanasyeva A, Senin V, Revazova E, Lukanidin E. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev.* 1989;3(7):1086-1093.

Eferl R, Hasselblatt P, Rath M, Popper H, Zenz R, Komnenovic V, Idarraga MH, Kenner L, Wagner EF. Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10525-10530.

EL Naaman C, Grum-Schwensen B, Mansouri A, Grigorian M, Santoni-Rugiu E, Hansen T, Kriajevska M, Schafer BW, Heizmann CW, Lukanidin E, Ambartsumian N. Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene. *Oncogene.* 2004;23(20):3670-3680.

Feghali-Bostwick C, Medsger TA, Jr., Wright TM. Analysis of systemic sclerosis in twins reveals low concordance for disease and high concordance for the presence of antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 2003;48(7):1956-1963.

Gershwin ME, Abplanalp H, Castles JJ, Ikeda RM, van der Water J, Eklund J, Haynes D. Characterization of a spontaneous disease of white leghorn chickens resembling progressive systemic sclerosis (scleroderma). *J Exp Med.* 1981;153(6):1640-1659.

Gibbs FE, Barraclough R, Platt-Higgins A, Rudland PS, Wilkinson MC, Parry EW. Immunocytochemical distribution of the calcium-binding protein p9Ka in normal rat tissues: variation in the cellular location in different tissues. *J Histochem Cytochem.* 1995;43(2):169-180.

Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol.* 1976;82(3):493-512.

Greenway S, van Suylen RJ, Du Marchie Sarvaas G, Kwan E, Ambartsumian N, Lukanidin E, Rabinovitch M. S100A4/Mts1 produces murine pulmonary artery changes resembling plexogenic arteriopathy and is increased in human plexogenic arteriopathy. *Am J Pathol.* 2004;164(1):253-262.

Grigorian M, Andresen S, Tulchinsky E, Kriaievska M, Carlberg C, Kruse C, Cohn M, Ambartsumian N, Christensen A, Selivanova G, Lukanidin E. Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem.* 2001;276(25):22699-22708.

Grigorian M, Tulchinsky E, Burrone O, Tarabykina S, Georgiev G, Lukanidin E. Modulation of mts1 expression in mouse and human normal and tumor cells. *Electrophoresis.* 1994;15(3-4):463-468.

Grum-Schwensen B, Klingelhofer J, Berg CH, El-Naaman C, Grigorian M, Lukanidin E, Ambartsumian N. Suppression of tumor development and metastasis formation in mice lacking the S100A4(mts1) gene. *Cancer Res.* 2005;65(9):3772-3780.

Harris ML, Rosen A. Autoimmunity in scleroderma: the origin, pathogenetic role, and clinical significance of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15(6):778-784.

Howell CD, Yoder T, Claman HN, Vierling JM. Hepatic homing of mononuclear inflammatory cells isolated during murine chronic graft-vs-host disease. *J Immunol.* 1989;143(2):476-483.

Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000;275(51):40096-40105.

Inamoto S, Murao S, Yokoyama M, Kitazawa S, Maeda S. Isoproterenol-induced myocardial injury resulting in altered S100A4 and S100A11 protein expression in the rat. *Pathol Int.* 2000;50(6):480-485.

Isobe T, Okuyama T. The amino-acid sequence of S-100 protein (PAP I-b protein) and its relation to the calcium-binding proteins. *Eur J Biochem.* 1978;89(2):379-388.

Jaffee BD, Claman HN. Chronic graft-versus-host disease (GVHD) as a model for scleroderma. I. Description of model systems. *Cell Immunol.* 1983;77(1):1-12.

Jungel A, Distler O, Schulze-Horsel U, Huber LC, Ha HR, Simmen B, Kalden JR, Pisetsky DS, Gay S, Distler JH. Microparticles stimulate the synthesis of prostaglandin E(2) via induction of cyclooxygenase 2 and microsomal prostaglandin E synthase 1. *Arthritis Rheum.* 2007;56(11):3564-3574.

Kahaleh MB. Raynaud phenomenon and the vascular disease in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(6):718-722.

Kahaleh MB, Sherer GK, LeRoy EC. Endothelial injury in scleroderma. *J Exp Med.* 1979;149(6):1326-1335.

Kawakita T, Espana EM, Higa K, Kato N, Li W, Tseng SC. Activation of Smad-mediated TGF-beta signaling triggers epithelial-mesenchymal transitions in murine cloned corneal progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2013;228(1):225-234.

Keirsebilck A, Bonne S, Bruyneel E, Vermassen P, Lukanidin E, Mareel M, van Roy F. E-cadherin and metastasin (mts-1/S100A4) expression levels are inversely regulated in two tumor cell families. *Cancer Res.* 1998;58(20):4587-4591.

Kimura K, Endo Y, Yonemura Y, Heizmann CW, Schafer BW, Watanabe Y, Sasaki T. Clinical significance of S100A4 and E-cadherin-related adhesion molecules in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2000;16(6):1125-1131.

Klingelhofer J, Senolt L, Baslund B, Nielsen GH, Skibshoj I, Pavelka K, Neidhart M, Gay S, Ambartsumian N, Hansen BS, Petersen J, Lukanidin E, Grigorian M. Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(3):779-789.

Kowal-Bielecka O, Landewe R, Avouac J, Chwiesko S, Miniati I, Czirjak L, Clements P, Denton C, Farge D, Fligelstone K, Foldvari I, Furst DE, Muller-Ladner U, Seibold J, Silver RM, Takehara K, Toth BG, Tyndall A, Valentini G, van den Hoogen F, Wigley F, Zulian F, Matucci-Cerinic M. EULAR recommendations for the treatment of systemic sclerosis: a report from the EULAR Scleroderma Trials and Research group (EUSTAR). *Ann Rheum Dis.* 2009;68(5):620-628.

Kozlova EN, Lukanidin E. Metastasis-associated mts1 (S100A4) protein is selectively expressed in white matter astrocytes and is up-regulated after peripheral nerve or dorsal root injury. *Glia.* 1999;27(3):249-258.

Kozlova EN, Lukanidin E. Mts1 protein expression in the central nervous system after injury. *Glia.* 2002;37(4):337-348.

Kriajevska M, Fischer-Larsen M, Moertz E, Vorm O, Tulchinsky E, Grigorian M, Ambartsumian N, Lukanidin E. Liprin beta 1, a member of the family of LAR transmembrane tyrosine phosphatase-interacting proteins, is a new target for the metastasis-associated protein S100A4 (Mts1). *J Biol Chem.* 2002;277(7):5229-5235.

Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Maitland N, Lomonosov M, Hansen K, Georgiev G, Lukanidin E. Metastasis-associated Mts1 (S100A4) protein modulates protein kinase C phosphorylation of the heavy chain of nonmuscle myosin. *J Biol Chem.* 1998;273(16):9852-9856.

Kriajevska MV, Cardenas MN, Grigorian MS, Ambartsumian NS, Georgiev GP, Lukanidin EM. Non-muscle myosin heavy chain as a possible target for protein encoded by metastasis-related mts-1 gene. *J Biol Chem.* 1994;269(31):19679-19682.

Krieg T, Abraham D, Lafyatis R. Fibrosis in connective tissue disease: the role of the myofibroblast and fibroblast-epithelial cell interactions. *Arthritis Res Ther*. 2007;9 Suppl 2:S4.

Lawson WE, Polosukhin VV, Zoia O, Stathopoulos GT, Han W, Plieth D, Loyd JE, Neilson EG, Blackwell TS. Characterization of fibroblast-specific protein 1 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(8):899-907.

Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 23):4803-4810.

LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest*. 1974;54(4):880-889.

LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2001;28(7):1573-1576.

Levy S, Nagler A, Okon S, Marmary Y. Parotid salivary gland dysfunction in chronic graft-versus-host disease (cGVHD): a longitudinal study in a mouse model. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25(10):1073-1078.

Li J, Helm K, Howell CD. Contributions of donor CD4 and CD8 cells to liver injury during murine graft-versus-host disease. *Transplantation*. 1996;62(11):1621-1628.

Lunardi C, Bason C, Navone R, Millo E, Damonte G, Corrocher R, Puccetti A. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. *Nat Med*. 2000;6(10):1183-1186.

Massague J, Gomis RR. The logic of TGFbeta signaling. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2811-2820.

Matsuura I, Lai CY, Chiang KN. Functional interaction between Smad3 and S100A4 (metastatin-1) for TGF-beta-mediated cancer cell invasiveness. *Biochem J.* 2010;426(3):327-335.

Maurer B, Busch N, Jungel A, Pilecky M, Gay RE, Michel BA, Schett G, Gay S, Distler J, Distler O. Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation.* 2009;120(23):2367-2376.

Mayes MD, Lacey JV, Jr., Beebe-Dimmer J, Gillespie BW, Cooper B, Laing TJ, Schottenfeld D. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum.* 2003;48(8):2246-2255.

Menton DN, Hess RA. The ultrastructure of collagen in the dermis of tight-skin (Tsk) mutant mice. *J Invest Dermatol.* 1980;74(3):139-147.

Menton DN, Hess RA, Lichtenstein JR, Eisen A. The structure and tensile properties of the skin of tight-skin (Tsk) mutant mice. *J Invest Dermatol.* 1978;70(1):4-10.

Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun.* 1965;19(6):739-744.

Nietert PJ, Silver RM. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factors. *Curr Opin Rheumatol.* 2000;12(6):520-526.

Novitskaya V, Grigorian M, Kriajevska M, Tarabykina S, Bronstein I, Berezin V, Bock E, Lukanidin E. Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 2000;275(52):41278-41286.

Pannu J, Trojanowska M. Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol.* 2004;16(6):739-745.

Parker C, Lakshmi MS, Piura B, Sherbet GV. Metastasis-associated mts1 gene expression correlates with increased p53 detection in the B16 murine melanoma. *DNA Cell Biol.* 1994;13(4):343-351.

Platt-Higgins AM, Renshaw CA, West CR, Winstanley JH, De Silva Rudland S, Barraclough R, Rudland PS. Comparison of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9ka) with other prognostic markers in human breast cancer. *Int J Cancer.* 2000;89(2):198-208.

Reich N, Maurer B, Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Zerr P, Palumbo K, Zwerina J, Nevskaya T, Gay S, Distler O, Schett G, Distler JH. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010;62(1):280-290.

Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J.* 1996;10(10):1183-1191.

Robertson H, Kirby JA, Yip WW, Jones DE, Burt AD. Biliary epithelial-mesenchymal transition in posttransplantation recurrence of primary biliary cirrhosis. *Hepatology.* 2007;45(4):977-981.

Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, Hogg N. The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277(5):3658-3665.

Rosty C, Ueki T, Argani P, Jansen M, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH, Goggins M. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. *Am J Pathol.* 2002;160(1):45-50.

Rudland PS, Platt-Higgins A, Renshaw C, West CR, Winstanley JH, Robertson L, Barraclough R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res.* 2000;60(6):1595-1603.

Ruzek MC, Jha S, Ledbetter S, Richards SM, Garman RD. A modified model of graft-versus-host-induced systemic sclerosis (scleroderma) exhibits all major aspects of the human disease. *Arthritis Rheum.* 2004;50(4):1319-1331.

Ryan DG, Taliana L, Sun L, Wei ZG, Masur SK, Lavker RM. Involvement of S100A4 in stromal fibroblasts of the regenerating cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(10):4255-4262.

Sack U, Walther W, Scudiero D, Selby M, Aumann J, Lemos C, Fichtner I, Schlag PM, Shoemaker RH, Stein U. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/beta-catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2011;22(18):3344-3354.

Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, Komura K, Hamaguchi Y, Kaburagi Y, Nagaoka T, Takehara K, Tedder TF, Sato S. CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest.* 2002;109(11):1453-1462.

Saleem M, Adhami VM, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H. Prognostic significance of metastasis-associated protein S100A4 (Mts1) in prostate cancer progression and chemoprevention regimens in an autochthonous mouse model. *Clin Cancer Res.* 2005;11(1):147-153.

Santamaria-Kisiel L, Rintala-Dempsey AC, Shaw GS. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J.* 2006;396(2):201-214.

Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, Simmen B, Michel BA, Pavelka K, Gay RE, Gay S, Neidhart M. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis.* 2006;65(12):1645-1648.

Sgonc R, Gruschwitz MS, Dietrich H, Recheis H, Gershwin ME, Wick G. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest.* 1996;98(3):785-792.

Sgonc R, Wick G. Pro- and anti-fibrotic effects of TGF-beta in scleroderma. *Rheumatology (Oxford)*. 2008;47 Suppl 5:v5-7.

Schneider M, Hansen JL, Sheikh SP. S100A4: a common mediator of epithelial-mesenchymal transition, fibrosis and regeneration in diseases? *J Mol Med (Berl)*. 2008;86(5):507-522.

Schneider M, Kostin S, Strom CC, Aplin M, Lyngbaek S, Theilade J, Grigorian M, Andersen CB, Lukanidin E, Lerche Hansen J, Sheikh SP. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2007;75(1):40-50.

Siracusa LD, McGrath R, Ma Q, Moskow JJ, Manne J, Christner PJ, Buchberg AM, Jimenez SA. A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res*. 1996;6(4):300-313.

Sonnylal S, Denton CP, Zheng B, Keene DR, He R, Adams HP, Vanpelt CS, Geng YJ, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B. Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum*. 2007;56(1):334-344.

Strupat K, Rogniaux H, Van Dorsselaer A, Roth J, Vogl T. Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2000;11(9):780-788.

Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S, Hasegawa Y, Sato K, Endo H. Binding of pEL98 protein, an S100-related calcium-binding protein, to nonmuscle tropomyosin. *J Cell Biol*. 1994;124(5):757-768.

Tarabykina S, Kriajevska M, Scott DJ, Hill TJ, Lafitte D, Derrick PJ, Dodson GG, Lukanidin E, Bronstein I. Heterocomplex formation between metastasis-related protein S100A4 (Mts1) and S100A1 as revealed by the yeast two-hybrid system. *FEBS Lett*. 2000;475(3):187-191.

Umezawa H, Ishizuka M, Maeda K, Takeuchi T. Studies on bleomycin. *Cancer*. 1967;20(5):891-895.

Valentini G, Silman AJ, Veale D. Assessment of disease activity. Clin Exp Rheumatol. 2003;21(3 Suppl 29):S39-41.

Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. J Clin Invest. 2007;117(3):557-567.

Varga J, Bashey RI. Regulation of connective tissue synthesis in systemic sclerosis. Int Rev Immunol. 1995;12(2-4):187-199.

Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. Annu Rev Med. 2003;54:29-52.

Wagner EF, Eferl R. Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system. Immunol Rev. 2005;208:126-140.

Wang G, Rudland PS, White MR, Barraclough R. Interaction in vivo and in vitro of the metastasis-inducing S100 protein, S100A4 (p9Ka) with S100A1. J Biol Chem. 2000;275(15):11141-11146.

Wick G, Andersson L, Hala K, Gershwin ME, Selmi C, Erf GF, Lamont SJ, Sgonc R. Avian models with spontaneous autoimmune diseases. Adv Immunol. 2006;92:71-117.

Woessner JF, Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch Biochem Biophys. 1961;93:440-447.

Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. Nat Rev Immunol. 2004;4(8):583-594.

Xie R, Schlumbrecht MP, Shipley GL, Xie S, Bassett RL, Jr., Broaddus RR. S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF-beta1 signaling. Lab Invest. 2009;89(8):937-947.

Yamamoto T, Nishioka K. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. Exp Dermatol. 2005;14(2):81-95.

Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, Nishioka K. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1999;112(4):456-462.

Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Kinoshita K, Ninomiya I, Sugiyama K, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2000;6(11):4234-4242.

Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, Ogawa F, Hara T, Muroi E, Takenaka M, Shimizu K, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Sato S. CD19 regulates skin and lung fibrosis via Toll-like receptor signaling in a model of bleomycin-induced scleroderma. *Am J Pathol.* 2008;172(6):1650-1663.

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007;13(8):952-961.

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med.* 2003;9(7):964-968.

Zeisberg M, Yang C, Martino M, Duncan MB, Rieder F, Tanjore H, Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23337-23347.

Zibert JR, Skov L, Thyssen JP, Jacobsen GK, Grigorian M. Significance of the S100A4 protein in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010;130(1):150-160.

První autor s IF – k tématu postgraduální práce (fulltext prací je součástí příloh):

1. **Tomcik M**, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Avouac J, Dees C, Distler A, Beyer C, Andres Cerezo L, Becvar R, Distler O, Grigorian M, Schett G, Senolt L, Distler JHW. S100A4 regulates TGF- β induced fibroblast activation in systemic sclerosis. Podáno do Ann Rheum Dis. v září 2013 (IF 9,111)
2. **Tomcik M**, Zerr P, Pitkowski J, Palumbo-Zerr K, Avouac J, Distler O, Becvar R, Senolt L, Schett G, Distler JH. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis. Ann Rheum Dis. 2013 May 9. [Epub ahead of print] (IF 9,111)
3. **Tomčík M**, Arima K, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Braun M, Beláček J, Novák M, Bečvář R, Vencovský J, Haluzík M, Gay S, Müller-Ladner U, Distler O, Senolt L. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in systemic sclerosis. Cytokine. 2012 May;58(2):165-8. (IF 2,518)

Spoluautor s IF – k tématu postgraduální práce:

1. Wei J, Zhu H, Komura K, Lord G, **Tomcik M**, Wang W, Doniparthi S, Tamaki Z, Hinchcliff M, Distler JH, Varga J. A synthetic PPAR- γ agonist triterpenoid ameliorates experimental fibrosis: PPAR- γ -independent suppression of fibrotic responses. Ann Rheum Dis. 2013 Mar 20. [Epub ahead of print] (IF 9,111)
2. Avouac J*, Elhai M*, **Tomcik M**, Ruiz B, Friese M, Piedavent M, Colonna M, Bernhardt G, Kahan A, Chiochia G, Distler JH, Allanore Y. Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2013 Jun;72(6):1089-98. (IF 9,111)
3. Zerr P, Distler A, Zerr KP, **Tomcik M**, Vollath S, Dees C, Egberts F, Tinazzi I, Del Galdo F, Distler O, Schett G, Spriewald BM, Distler JH. Combined Inhibition of c-Abl and PDGF Receptors for Prevention and Treatment of Murine Sclerodermatous Chronic Graft-versus-Host Disease. Am J Pathol. 2012 Nov;181(5):1672-80. (IF 4,522)

4. Zerr P, Palumbo-Zerr K, Distler A, **Tomcik M**, Vollath S, Munoz LE, Beyer C, Dees C, Egberts F, Tinazzi I, Del Galdo F, Distler O, Schett G, Spriewald BM, Distler JH. Inhibition of hedgehog signaling for the treatment of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2012 Oct 4;120(14):2909-17. (IF 9,060)
5. Weingärtner S, Zerr P, **Tomcik M**, Palumbo-Zerr K, Distler A, Dees C, Beyer C, Shankar SL, Cedzik D, Schafer PH, Distler O, Schett G, Distler JH. Pomalidomide is effective for prevention and treatment of experimental skin fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Nov;71(11):1895-9. (IF 9,111)
6. Dees C, **Tomcik M**, Palumbo-Zerr K, Akhmetshina A, Beyer C, Lang V, Horn A, Zerr P, Zwerina J, Gelse K, Distler O, Schett G, Distler JH. JAK2 as a novel mediator of the pro-fibrotic effects of TGF β in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2012 Sep;64(9):3006-15. (IF 7,477)
7. Horn A, Kireva T, Palumbo-Zerr K, Dees C, **Tomcik M**, Cordazzo C, Zerr P, Akhmetshina A, Ruat M, Distler O, Beyer C, Schett G, Distler JH. Inhibition of hedgehog signalling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2012 May;71(5):785-9. (IF 9,111)
8. Horn A, Palumbo K, Cordazzo C, Dees C, Akhmetshina A, **Tomcik M**, Zerr P, Avouac J, Gusinde J, Zwerina J, Roudaut H, Traiffort E, Ruat M, Distler O, Schett G, Distler JH. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2012 Aug;64(8):2724-33. (IF 7,477)
9. Beyer C, Reich N, Schindler SC, Akhmetshina A, Dees C, **Tomcik M**, Hirth-Dietrich C, von Degenfeld G, Sandner P, Distler O, Schett G, Distler JH. Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):1019-26. (IF 9,111)
10. Reich N, **Tomcik M**, Zerr P, Lang V, Dees C, Avouac J, Palumbo K, Horn A, Akhmetshina A, Beyer C, Xie W, Bennett BL, Distler O, Schett G, Distler JH. Jun N-terminal kinase as a potential molecular target for prevention and treatment of dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis*. 2012 May;71(5):737-45. (IF 9,111)
11. Avouac J, Palumbo K, **Tomcik M**, Zerr P, Dees C, Horn A, Maurer B, Akhmetshina A, Beyer C, Sadowski A, Schneider H, Shiozawa S, Distler O, Schett G, Allanore Y, Distler JH. Inhibition of AP-1 signaling abrogates TGF- β mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2012 May;64(5):1642-52. (IF 7,477)

12. Palumbo K*, Zerr P*, **Tomcik M**, Vollath S, Dees C, Akhmetshina A, Avouac J, Yaniv M, Distler O, Schett G, Distler JH. The transcription factor JunD mediates transforming growth factor beta-induced fibroblast activation and fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jul;70(7):1320-6. (IF 8,727)
13. Dees C, **Tomcik M**, Zerr P, Akhmetshina A, Horn A, Palumbo K, Beyer C, Zwerina J, Distler O, Schett G, Distler JH. Notch signalling regulates fibroblast activation and collagen release in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2011 Jul;70(7):1304-10. (IF 8,727)
14. Dees C, Zerr P, **Tomcik M**, Beyer C, Horn A, Akhmetshina A, Palumbo K, Reich N, Zwerina J, Sticherling M, Mattson MP, Distler O, Schett G, Distler JH: Inhibition of Notch signaling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2011 May;63(5):1396-404. (IF 7,866)
15. Avouac J, F rnrohr BG, **Tomcik M**, Palumbo K, Zerr P, Horn A, Dees C, Akhmetshina A, Beyer C, Distler O, Schett G, Allanore Y, Distler JH.: Inactivation of the transcription factor STAT4 prevents inflammation-driven fibrosis in systemic sclerosis animal models. *Arthritis Rheum*. 2011 Mar;63(3):800-9. (IF 7,866)
16. Marquart S, Zerr P, Akhmetshina A, Palumbo K, Reich N, **Tomcik M**, Horn A, Dees C, Engel M, Zwerina J, Distler O, Schett G, Distler JH: Inactivation of the cannabinoid receptor CB1 prevents leukocyte infiltration and experimental fibrosis. *Arthritis Rheum*. 2010 Nov;62(11):3467-76. (IF 8,435)

Další publikace s IF – mimo téma postgraduální práce:

1. Kuncova K, Sedlackova M, Vencovsky J, Mann H, **Tomcik M**, Wenchich L, Zamecnik J. Inflammatory myopathy associated with statins: report of three cases. *Mod Rheumatol*. 2012 Oct 17. [Epub ahead of print] (IF 1,716)
2. Jansa P, Becvar R, Ambroz D, Palecek T, **Tomcik M**, Skacelova S, Aschermann M, Linhart A. Pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis in the Czech Republic. *Clin Rheumatol*. 2012 Mar;31(3):557-61. (IF 2,037)
3. Andr s Cerezo L, Kuncov  K, Mann H, **Tomcik M**, Z amecn k J, Lukanidin E, Neidhart M, Gay S, Grigorian M, Vencovsky J, Senolt L The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford)*. 2011 Oct;50(10):1766-72. (IF 4,057)

První autor prezentace formou přednášky – k tématu postgraduální práce:

1. 57. sjezd slovenských a českých revmatologů, Žilina - IX/2013:

M. Tomčík, L. Andres Cerezo, S. Skacelova, M. Komarc, R. Becvar, M. Grigorian, JHW.

Distler, L. Senolt. Sérové koncentrace S100A4 korelují s kožní fibrózou, plicním postižením a aktivitou nemoci u systémové sklerodermie.

2. 14. Studentská vědecká konference 1.LFUK, postgraduální klinická sekce, Praha – V/2013:

M. Tomčík. Inhibition of Heat Shock Protein 90 (Hsp90) targets canonical TGF- β signaling to prevent fibrosis in systemic sclerosis. (udělena 2.cena)

3. Konference Revmatologického ústavu k 60.výročí, Praha XII/2012:

M. Tomčík. Novel findings in fibrosis – future therapy of systemic sclerosis.

4. 56. sjezd českých a slovenských revmatologů, Olomouc - IX/2012:

M. Tomčík, N. Reich, K. Palumbo, P. Zerr, J. Avouac, A. Akhmetshina, J. Robinson, C. Dees, C. Beyer, R. Bečvář, L. Šenolt, O. Distler, G. Schett, JHW. Distler. Imatinib mesylát nemá výraznější antifibrotické účinky než selektivní inhibitor PDGFR (ARRY-768) v preklinických modelech systémové sklerodermie.

5. 56. sjezd českých a slovenských revmatologů, Olomouc - IX/2012:

M. Tomčík, K. Palumbo, P. Zerr, BG. Fűrnrrohr, J. Avouac, A. Horn, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, L. Andrés Cerezo, R. Bečvář, O. Distler, M. Grigorian, L. Šenolt, G. Schett, JHW. Distler. S100A4 je novým mediátorem aktivace fibroblastů indukované TGF- β a kožní fibrózy u systémové sklerodermie.

6. EULAR, Annual European Congress of Rheumatology, Berlín - VI/2012:

M. Tomčík, K. Palumbo, J. Avouac, A. Horn, A. Khodzhigorova, P. Zerr, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, R. Becvar, L. Senolt, O. Distler, G. Schett, J.H.W. Distler. Tribbles Homolog 3 mediates the stimulatory effects of TGF- β on fibroblast activation and dermal fibrosis in systemic sclerosis.

7. 13. Studentská vědecká konference 1.LFUK, postgraduální klinická sekce, Praha – V/2012:

M. Tomčík. S100A4 is a novel mediator of TGF- β driven dermal fibrosis in systemic sclerosis. (udělena hlavní cena)

8. 8th International Medical Postgraduate Conference, Hradec Králové - XI/2011:

M. Tomcik, K. Palumbo, P. Zerr, B. G. Fuernrohr, J. Avouac, A. Horn, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, L. Andres Cerezo, R. Bečvář, O. Distler, M. Grigorian, G. Schett, L. Šenolt, J. H. W. Distler. The role of S100A4 protein in the pathogenesis of systemic sclerosis. (udělena 2.cena a ORPHEUS award for the author of outstanding research)

9. ACR, American College of Rheumatology Basic Scientific Meeting, Chicago - XI/2011:

M. Tomcik, K. Palumbo, J. Avouac, A. Horn, A. Khodzhigorova, P. Zerr, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, R. Becvar, L. Senolt, O. Distler, G. Schett, J.H.W. Distler. Tribbles Homolog 3 (TRB-3) mediates TGF- β driven dermal fibrosis in systemic sclerosis.

První autor prezentace formou posteru / poster guided tour – k tématu postgraduální práce:

1. ACR, American College of Rheumatology Basic Scientific Meeting, San Diego - X/2013:

M. Tomcik, L. Andres Cerezo, S. Skacelova, M. Komarc, R. Becvar, M. Grigorian, J. H.W.Distler, L. Senolt. Serum S100A4 levels correlate with skin fibrosis and lung involvement in systemic sclerosis.

2. EULAR, Annual European Congress of Rheumatology, Madrid - VI/2013:

M. Tomcik, P. Zerr, J. Pitkowski, K. Palumbo-Zerr, J. Avouac, O. Distler, R. Becvar, M. Haslbeck, L. Senolt, G. Schett, J. H. Distler. Inhibition of heat shock protein 90 (hsp90) prevents fibrosis by targeting canonical tgf- β signaling.

3. EULAR, Annual European Congress of Rheumatology, Berlín - VI/2012:

M. Tomcik, N. Reich, K. Palumbo, P. Zerr, J. Avouac, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, R. Becvar, L. Senolt, O. Distler, G. Schett, J.H.W. Distler. Effects of imatinib mesylate are not superior to selective inhibition of PDGFR by ARRY-768 in preclinical model of dermal fibrosis.

4. 2nd SScWC, 2nd Systemic Sclerosis World Congress, Madrid - II/2012:

M. Tomcik, K. Palumbo, P. Zerr, B. G. Fuernrohr, J. Avouac, A. Horn, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, L. Andres Cerezo, R. Becvar, O. Distler, M. Grigorian, L. Senolt, G. Schett, J. H. W. Distler. S100A4 is a novel mediator of tgf-b driven fibroblasts activation and dermal fibrosis in SSc. (udělena Award for one of the best and most original works presented)

5. ACR, American College of Rheumatology Basic Scientific Meeting, Chicago - XI/2011:
M. Tomcik, N. Reich, K. Palumbo, P. Zerr, J. Avouac, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, R. Becvar, L. Senolt, O. Distler, G. Schett, J.H.W. Distler. PDGFR inhibitor ARRY-768 prevents experimental dermal fibrosis and induces regression of pre-established dermal fibrosis.
6. EULAR, Annual European Congress of Rheumatology, Londýn - V/2011:
M. Tomcik, K. Palumbo, P. Zerr, B. G. Fuernrohr, J. Avouac, A. Horn, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, L. Andres Cerezo, R. Becvar, O. Distler, M. Grigorian, L. Senolt, G. Schett, J. H. Distler. S100A4 mediates the profibrotic effects of TGF-beta in dermal fibrosis in systemic sclerosis.
7. ACR, American College of Rheumatology Basic Scientific Meeting, Atlanta - XI/2010:
M. Tomcik, P. Zerr, K. Palumbo, B.G. Fűrnrrohr, J. Avouac, A. Horn, C. Dees, A. Akhmetshina, C. Beyer, R. Becvar, O. Distler, M. Grigorian, L. Senolt, G. Schett, J. H. W. Distler. S100A4 as a Novel Mediator of TGF- β Driven Dermal Fibrosis in Systemic Sclerosis.
8. EULAR, Annual European Congress of Rheumatology, Kodaň – VI/2009:
M. Tomcik, K. Arima, H. Hulejova, M. Polanska, M. Filkova, R. Becvar, M. Haluzik, S. Gay, O. Distler, L. Senolt. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in patients with systemic sclerosis.
9. CECR, Central European Congress of Rheumatology, Praha – V/2008:
M. Tomčik, H. Hulejová, M. Filková, M. Braun, R. Bečvář, M. Haluzík, L. Šenolt. Adiponectin may be related to skin changes in patients with systemic sclerosis.

11 PODĚKOVÁNÍ

Na závěr bych velmi rád poděkoval svému školiteli Doc. MUDr. Radimovi Bečvářovi, CSc. a odbornému konzultantovi Doc. MUDr. Ladislavu Šenoltovi, PhD. za příkladné vedení, pomoc při postgraduálním studiu, profesním růstu a uvedení do oboru revmatologie, konkrétně systémové sklerodermie. Chci poděkovat Prof. MUDr. Karlu Pavelkovi, DrSc., řediteli Revmatologického ústavu v Praze, za podporu a umožnění zahraničního studijního pobytu v Department for Internal Medicine 3 v Erlangenu. Mé poděkování patří i PD Dr. med. Joergovi Distlerovi v Department for Internal Medicine 3 v Erlangenu, pod jehož vedením jsem měl možnost získat základní znalosti v oblasti bazálního výzkumu u SSc a pracovat na různých výzkumných projektech. Poděkování patří i třem kolegům z Erlangenu, M.Sc. Pawel Zerr, M.Sc. Katrin Palumbo-Zerr a MD Jérôme Avouac, PhD., za zasvěcení do základních laboratorních metod a pomoc a podporu nejenom při práci v laboratoři. Děkuji všem kolegům a spoluautorům v Revmatologickém ústavu v Praze, především Mgr. Lucii Andrés Cerezo, PhD., Mgr. Markétě Kuklové a MUDr. Márii Filkové, PhD. za spolupráci a pomoc při řešení projektů. Výzkumné projekty, ze kterých vychází tato disertační práce, a pobyt v Erlangenu by se neobešly bez finanční podpory následujících institucí: Výzkumné záměry MZČR (00023728), EULAR Research Training Bursary, Fond Mobility Univerzity Karlovy v Praze, Abbott, OPFA European Social Fund Prague & EU: Supporting Your Future (CZ.2.17/1.1.00/32698) a SVV: 262512.

Rád bych dál poděkoval MDDr. Alise Samoilové za trpělivé čtení a korekturu disertační práce a autoreferátu a neocenitelnou podporu. Moje hlavní poděkování patří mým rodičům a mé sestře Katce. Pro ně asi zůstane tato práce navždy nevyluštěnou hádankou, ale bez jejich podpory a pomoci v průběhu pre- i postgraduálního studia bych nebyl tam, kde jsem.

12 PŘÍLOHY

Součástí příloh jsou publikace s IF (fulltext, první autor) k tématu disertační práce:

1. Tomcik M, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Avouac J, Dees C, Distler A, Beyer C, Andres Cerezo L, Becvar R, Distler O, Grigorian M, Schett G, Senolt L, Distler JHW. S100A4 regulates TGF- β induced fibroblast activation in systemic sclerosis. Podáno do Ann Rheum Dis. v září 2013 (IF 9,111)
2. Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, Palumbo-Zerr K, Avouac J, Distler O, Becvar R, Senolt L, Schett G, Distler JH. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis. Ann Rheum Dis. 2013 May 9. [Epub ahead of print] (IF 9,111)
3. Tomčík M, Arima K, Hulejová H, Kuklová M, Filková M, Braun M, Beláček J, Novák M, Bečvář R, Vencovský J, Haluzík M, Gay S, Müller-Ladner U, Distler O, Senolt L. Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in systemic sclerosis. Cytokine. 2012 May;58(2):165-8. (IF 2,518)

S100A4 regulates TGF- β induced fibroblast activation in systemic sclerosis

Michal Tomcik ^{1,2}, Katrin Palumbo-Zerr ¹, Pawel Zerr ¹, Jerome Avouac ³, Clara Dees ¹, Alfiya Distler ¹, Christian Beyer ¹, Lucie Andres Cerezo ², Radim Becvar ², Oliver Distler ⁴, Mariam Grigorian ⁵, Georg Schett ¹, Ladislav Senolt ², Jörg H. W. Distler ¹

¹ Department of Internal Medicine III and Institute for Clinical Immunology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany; ² Institute of Rheumatology, Department of Rheumatology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic; ³ Paris Descartes University, Rheumatology A Department, Cochin Hospital, Paris, France; ⁴ Center of Experimental Rheumatology and Zurich Center of Integrative Human Physiology, University Hospital, Zurich, Switzerland; ⁵ Neuro-Oncology Group, Institute of Neuroscience and Pharmacology, Faculty of Health Sciences, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark

Corresponding author and reprint requests:

Michal Tomcik, Institute of Rheumatology, Department of Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University, Na Slupi 4, 128 50 Prague 2, Czech Republic, Phone: +420-234075244, Fax: +420-224914451, E-mail: tomcik@revma.cz

and

Jörg H. W. Distler, MD; Department of Internal Medicine 3 and Institute for Clinical Immunology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany, Tel.: +49 9131 43008, Fax: +49 9131 39226, E-mail: joerg.distler@uk-erlangen.de

Word count: 2999

ABSTRACT

Objectives: S100A4 is a calcium binding protein with regulatory functions in cell homeostasis, proliferation and differentiation that has been shown to promote cancer progression and metastasis. In the present study, we evaluated the role of S100A4 in fibroblast activation in systemic sclerosis (SSc).

Methods: The expression of S100A4 was analyzed in human samples, murine models of SSc and in cultured fibroblasts by real-time PCR, immunohistochemistry and western blot. The functional role of S100A4 was evaluated using siRNA, overexpression, recombinant protein and S100A4 knockout (S100A4^{-/-}) mice. TGF- β signaling was assessed by reporter assays, staining for phosphorylated Smad2/3 and analyses of target genes.

Results: The expression of S100A4 was increased in SSc skin and in experimental fibrosis in a TGF- β / Smad dependent manner. Overexpression of S100A4 or stimulation with recombinant S100A4 induced an activated phenotype in resting normal fibroblasts. In contrasts, knockdown of S100A4 reduced the pro-fibrotic effects of TGF- β and decreased the release of collagen. S100A4^{-/-} mice were protected from bleomycin-induced skin fibrosis with reduced dermal thickening, decreased hydroxyproline content and lower myofibroblast counts. Deficiency of S100A4 also ameliorated fibrosis in the tight-skin-1 (Tsk-1) mouse model.

Conclusions: We characterized S100A4 as a downstream mediator of the stimulatory effects of TGF- β on fibroblasts in SSc. TGF- β induces the expression of S100A4 to stimulate the release of collagen in SSc fibroblasts and induce fibrosis. Since S100A4 is essentially required for the pro-fibrotic effects of TGF- β and neutralizing antibodies against S100A4 are currently evaluated, S100A4 might be a candidate for novel anti-fibrotic therapies.

Key words: S100A4, fibrosis, scleroderma, Smad3, fibroblasts

INTRODUCTION

Systemic sclerosis (SSc) is a connective tissue disease characterized by pathological remodeling of connective tissue. The hallmark of SSc is an excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) caused by an increased release of collagen and other ECM components by pathologically activated fibroblasts [1]. Considerable evidence demonstrates a fundamental role of transforming growth factor β (TGF- β) in the pathogenesis of SSc and other fibrotic diseases. TGF- β signaling is persistently activated in fibrotic diseases, upregulates the synthesis of collagen in fibroblasts and induces fibrosis *in vivo* [2]. Moreover, TGF- β induces an expression profile in resting normal fibroblasts that is reminiscent of SSc fibroblasts. However, the knowledge of the central role of TGF- β in the aberrant activation of SSc has not yet been successfully translated into effective anti-fibrotic therapies.

S100A4 (also known as metastasin, calvasculin, pEL98, 18A2, FSP1, p9Ka and 42A) is a 101 amino acid protein with a molecular mass of 12 kDa, which belongs to the family of EF-hand calcium binding S100 proteins [3]. S100A4 has intra- as well as extracellular functions. Intracellular S100A4 regulates several processes that are fundamental for cell homeostasis and differentiation such as gene transcription, cytoskeletal rearrangement and cell proliferation [4]. When secreted into extracellular space, S100A4 exerts cytokine-like effects and regulates remodeling of ECM [5], angiogenesis [6] and cell survival [7]. S100A4 has been extensively studied in tumors and described to promote tumor progression and metastasis [3, 8]. However, more recently, it became apparent that S100A4 is also implicated in pathogenesis of non-malignant human disorders. Of particular interest, S100A4 has been described to be involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [5, 9] and inflammatory myopathies [10]. In rheumatoid arthritis, increased expression of S100A4 might contribute to

the aggressive phenotype of RA synovial fibroblasts [11]. Increased expression of S100A4 in inflammatory myopathies may act as a cytokine-like factor and promote muscle fiber damage by stimulating the release of pro-inflammatory cytokines from mononuclear cells [10].

In the present study, we evaluated the role of S100A4 in the pathogenesis of SSc. We demonstrate that TGF- β stimulates the expression of S100A4 in SSc and that the induction of S100A4 is required for the pro-fibrotic effects of TGF- β .

MATERIAL AND METHODS

Patients and fibroblast cultures

Dermal fibroblasts were isolated from skin biopsies of SSc patients (n = 20) and matched healthy volunteers (n = 18) as described [12, 13]. All SSc patients fulfilled the criteria for SSc as suggested by LeRoy et al [14]. Sixteen patients were female, four were male. Twelve had limited cutaneous SSc and eight had diffuse cutaneous SSc. The median age of SSc patients was 47 years (range: 19 - 66 years), and their median disease duration was 5 years (range: 0.5 - 11 years). None of the patients received disease-modifying antirheumatic drugs or glucocorticoids at the time of biopsy. All patients and control subjects signed a consent form approved by the local institutional review boards.

Stimulation with S100A4 and TGF- β

In selective experiments, cells were incubated with recombinant TGF- β (10 ng/ml) (PeproTech, Hamburg, Germany), or recombinant S100A4 protein at 0.01, 0.1, 1 or 10 μ g/ml (R&D Systems, Abingdon, UK).

Cloning of human S100A4

The sequences of the primer pairs used for the amplification of the human S100A4 gene are shown in the supplementary table 1. The PCR products were ligated into pcDNA3.1(+) expression vectors (Life Technologies, Darmstadt, Germany). After sequencing, plasmids were introduced into *Escherichia coli* Dh5 α (Novagen, Darmstadt, Germany) cells and selected by ampicillin. Single colonies were picked and tested by PCR. After amplification in LB medium, plasmids were isolated using a commercial isolation kit (Promega, Madison, USA).

Overexpression and knockdown experiments

For S100A4 overexpression experiments, 5 µg of the plasmid constructs were transfected in dermal fibroblasts using the 4D-Nucleofector (Lonza, Cologne, Germany). Gene silencing was achieved by transfection of 3 µg pre-designed siRNA duplexes against S100A4 or Smad3 (both from Thermo Scientific, Bonn, Germany) as described [15, 16]. Empty pcDNA3.1(+) vectors and non-targeting siRNAs (Life Technologies, Darmstadt, Germany) served as controls. The sequences of the used siRNAs are shown in the supplementary table 2.

Reporter assays

Cells were transfected with the -353 colla2-Luc construct or a common pSv-β-Galctosidase Control vector (β-gal). The -353 colla2-Luc construct contains the fragment between -353 and +58 nucleotides of the colla2 gene and was kindly provided by M. Trojanowska [17, 18]. For selective experiments, cells were transduced with 1000 MOI of Ad-CAGA-Luc construct or Ad-LacZ as a control for transduction efficiency [19]. Luciferase activity was determined using a microplate luminometer (Berthold Technologies, Bad Herrenalb, Germany).

Quantitative real time-PCR

Gene expression was quantified by SYBR Green real-time PCR using an ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Life Technologies, Darmstadt, Germany) [20, 21]. The sequences of all primers are given in supplementary table 3. β-actin was used to normalize for the amounts of loaded cDNA. Dissociation curve analysis, samples without enzyme in reverse transcription (non-RT controls), and no-template controls were used as negative controls to exclude genomic DNA contamination and formation of primer dimers. Differences were calculated by the comparative Ct method for relative quantification.

Western blot analysis

Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membrane was incubated overnight with rabbit anti-S100A4 antibodies [22] and horseradish peroxidase–conjugated secondary antibodies (Dako, Glostrup, Denmark). β -actin antibodies were used as loading controls [23].

Quantification of collagen protein

The amount of soluble collagen in cell culture supernatants was quantified using the SirCol collagen assay (Biocolor, Belfast, Northern Ireland) as previously described [24].

Immunohistochemistry and immunofluorescence staining

Skin sections and dermal fibroblasts were stained with rabbit anti-S100A4 antibodies [22], mouse anti- α -smooth muscle actin (α SMA) antibodies (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) or goat anti-p-Smad2/3 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) [25, 26]. HRP- or Alexa-Fluor conjugated antibodies (Life Technologies, Darmstadt, Germany) were used as secondary antibodies. Irrelevant isotype matched immunoglobulins were used as controls. Stress fibers were visualized with rhodamine-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich) as previously described [18]. In addition, nuclei were visualized with DAPI (Sigma-Aldrich). The fluorescence intensity was quantified using ImageJ software version 1.44.

Mouse models of fibrosis

Mice deficient in S100A4 have previously been described [27]. The mouse model of bleomycin-induced skin fibrosis was performed according to established protocols [28, 29]. To study the effect of S100A4 on the Tsk, S100A4-deficient mice (S100A4^{-/-}) were crossed

with tight-skin-1 (Tsk-1) mice [30, 31]. Genotyping of Tsk-1 mice and S100A4^{-/-} mice was performed by polymerase chain reaction with the primers shown in supplementary table 4.

Analysis of murine skin

Dermal thickness, myofibroblasts counts and hydroxyproline content were analyzed as described previously [32-37].

Statistics

All data are presented as median with interquartile range (IQR), and differences between the groups were analyzed using the Mann-Whitney-U test. P-values are expressed as follows: $0.05 > p > 0.01$ as *; $0.01 > p > 0.001$ as **; $p < 0.001$ as ***.

RESULTS

S100A4 expression is increased in SSc fibroblasts

S100A4 protein was upregulated in the lesional skin of SSc patients as compared with healthy individuals both on the mRNA and the protein level (Fig. 1A and B). In healthy volunteers, S100A4 protein was expressed at low levels in a limited number of fibroblasts, vessels and in epidermal keratinocytes. In contrast, a prominent staining for S100A4 was detected in SSc fibroblasts, in particular in the papillary layer of the dermis. Keratinocytes and endothelial cells also stained positive for S100A4 in SSc patients, but the staining intensity and the staining pattern did not differ from healthy individuals (Fig. 1B). Of particular interest, α -smooth muscle actin (α SMA) positive myofibroblasts stained particularly intense for S100A4 (Suppl. Fig. 1).

Consistent with the findings in SSc, expression of S100A4 protein was also increased in two common mouse models of SSc. Increased mRNA levels and staining for S100A4 were also detected in mice challenged with bleomycin (Fig. 1C and D) and in Tsk-1 mice (Fig. 1E and F).

TGF- β induces S100A4 in a Smad3-dependent manner

The overexpression of S100A4 persisted in cultured SSc fibroblasts, which maintained increased mRNA and protein levels of S100A4 as compared to control fibroblasts even after several passages in culture (Fig. 2A and B). TGF- β signaling is a common feature of fibrotic diseases and persistently enhanced TGF- β has been shown to contribute to the activated phenotype of cultured SSc fibroblasts. We therefore hypothesized that TGF- β signaling may stimulate the expression of S100A4. Indeed, S100A4 positive fibroblasts in the lesional skin of SSc patients uniformly co-stained for phosphorylated Smad2/3 (p-Smad2/3), demonstrating

activation of canonical TGF- β in S100A4 expressing fibroblasts (Fig. 2C). Incubation of fibroblasts from healthy individuals with TGF- β increased the mRNA and protein levels of S100A4 (Fig. 2D and E). The induction of S100A4 by TGF- β was dependent on canonical TGF- β / Smad signaling, as knockdown of Smad3 abrogated the stimulatory effects of TGF- β on the expression of S100A4 both on mRNA and protein level (Fig. 2D and E).

S100A4 induces fibroblast activation and collagen synthesis

To analyze the functional consequences of the upregulation of S100A4 in SSc, we overexpressed S100A4 in fibroblasts. Transfection with pcDNA3.1_S100A4 expression vectors resulted in strongly increased mRNA and protein levels of S100A4 compared to controls (Suppl. Fig. 2A and B). Overexpression of S100A4 activated canonical TGF- β / Smad signaling in fibroblasts with enhanced activity in Smad Binding Element (SBE) reporter assays (Fig. 3A), increased accumulation of p-Smad2/3 (Fig. 3B) and upregulation of classical TGF- β / Smad target genes such as PAI-1 and Smad7 (Fig. 3C). Consistent with activated TGF- β signaling, the release of collagen was also increased. Overexpression of S100A4 stimulated the activity of col1a2 reporter assays (Fig. 3D), induced the mRNA levels of col 1a1 and col 1a2 (Fig. 3E) and increased the release of collagen protein into the supernatants (Fig. 3F).

We next analyzed, whether extracellular S100A4 can also activate the release of collagen in fibroblasts. Indeed, recombinant S100A4 induced accumulation of p-Smad2/3 (Suppl. Fig. 3A), increased the expression of α SMA (Suppl. Fig. 3B) and upregulated the mRNA expression of typical Smad target genes PAI-1 and Smad7 (Suppl. Fig. 3C). In line with activated TGF- β signaling, recombinant S100A4 induced the mRNA levels of col 1a1 and col 1a2 (Suppl. Fig. 3D) and increased the release of collagen protein into the supernatants in a dose-dependent manner (Suppl. Fig. 3E).

Knockdown of S100A4 abrogates the stimulatory effects of TGF- β on fibroblasts

Based on the findings that TGF- β induces the expression of S100A4 and that S100A4 potentially activates resting fibroblasts, we speculated that S100A4 may be a downstream mediator of the pro-fibrotic effects of TGF- β . To test this hypothesis, we assessed the effects of TGF- β in S100A4 knock-down fibroblasts. Transfection of cultured fibroblasts with siRNA against S100A4 effectively reduced the expression of S100A4 on both mRNA and protein level (Suppl. Fig. 4A and B). Knockdown of S100A4 did not affect the expression of TGF- β target genes in resting cells or reduce the basal collagen synthesis (Fig. 4A - F). However, knockdown of S100A4 inhibited TGF- β signaling with decreased SBE- reporter activity (Fig. 4A), inhibition of Smad2/3 phosphorylation (Fig. 4B) and impaired induction of PAI-1 and Smad7 (Fig. 4C). siRNA-mediated knockdown of S100A4 also inhibited the stimulatory effects of TGF- β on collagen synthesis with reduced colla2 reporter activation (Fig. 4D), decreased levels of col 1a1- and col 1a2 mRNA (Fig. 4E) and decreased release of collagen protein in S100A4 knockdown fibroblasts compared to fibroblasts transfected with scrambled siRNA (Fig. 4F).

Similar to the results with siRNA-mediated knockdown of S100A4 in human fibroblasts, the pro-fibrotic effects of TGF- β were also blunted in murine fibroblasts isolated from S100A4^{-/-} mice as compared to fibroblasts from wildtype mice (S100A4^{+/+}) (Suppl. Fig. 5A-D). Together, these results demonstrate that S100A4 is a crucial mediator of the pro-fibrotic effects of TGF- β .

S100A4 knockout mice are protected from bleomycin-induced fibrosis

We next aimed to analyze the role of S100A4 on fibroblast activation *in vivo*. We first evaluated the outcome of S100A4^{-/-} in the model of bleomycin-induced skin fibrosis, which serves as a model for early, inflammatory stages of SSc [38]. S100A4^{-/-} mice were protected from bleomycin-induced fibrosis with a 74 % reduction in dermal thickening compared to S100A4^{+/+} mice ($p < 0.01$) (Fig. 5A and B). Furthermore, the hydroxyproline content in lesional skin and differentiation of resting fibroblasts into myofibroblasts were also significantly reduced in S100A4^{-/-} mice (Fig. 5C and D). Consistent with the *in vitro* findings, activation of canonical TGF- β / Smad signaling was impaired in S100A4^{-/-} mice with reduced nuclear accumulation of p-Smad2/3 in S100A4^{-/-} mice upon bleomycin challenge compared to S100A4^{+/+} littermates (Fig. 5E).

Deficiency in S100A4 ameliorates fibrosis in Tsk-1 mice

To confirm the anti-fibrotic effects of the deficit of S100A4 in another, less inflammatory mouse model resembling later, non-inflammatory stages of fibrosis [38], the Tsk-1 model was used. Hypodermal thickening was reduced by 66 % in S100A4^{-/-} mice carrying the Tsk-1 allele (S100A4^{-/-} Tsk-1 mice) compared to Tsk-1 mice expressing normal levels of S100A4 (S100A4^{+/+} Tsk-1 mice) ($p < 0.001$) (Fig. 6A and B). The hydroxyproline content and the myofibroblast counts were also reduced in S100A4^{-/-} Tsk-1 mice (Fig. 6C and D). We also observed significantly lower levels of nuclear p-Smad2/3 in S100A4^{-/-} Tsk-1 mice compared to S100A4^{+/+} Tsk-1 littermates (Fig. 6E).

DISCUSSION

The present study demonstrates that S100A4 is upregulated in SSc and in different models of experimental fibrosis. The expression of S100A4 was strongly increased in fibrotic skin, in particular in myofibroblasts in the papillary layer of the dermis. Our data show on multiple experimental levels that the upregulation of S100A4 in SSc is mediated by canonical TGF- β signaling: (I) The expression pattern of S100A4 co-localized with staining for p-Smad2/3, the central mediators of canonical TGF- β signaling. (II) Incubation with recombinant TGF- β upregulated the mRNA and protein levels of S100A4. (III) Knockdown of Smad3 completely abrogated the stimulatory effects of TGF- β on S100A4 expression. (IV) The expression of S100A4 was also upregulated in cultured SSc fibroblasts even after several passages in culture, which is in line with endogenous activation of TGF- β signaling in cultured SSc fibroblasts [39]. The stimulatory effects of TGF- β on S100A4 are not restricted to fibroblasts, but TGF- β also upregulates S100A4 in epithelial cells such as endometrial cancer cells [40] and in multipotent corneal progenitor cells [41]. These findings also identify TGF- β as an important regulator of S100A4, however, other factors such as hypoxia may also contribute to the expression of S100A4 in SSc. Indeed, the oxygen levels are severely decreased in SSc [42, 43] and hypoxia has recently been shown to induce the expression of S100A4 [44].

Our study presents evidence that S100A4 may serve to amplify canonical TGF- β signaling in SSc. S100A4 is not only induced by TGF- β , but also actively promotes canonical TGF- β signaling in fibroblasts. Overexpression of S100A4 or stimulation with recombinant S100A4 potently activated TGF- β signaling even in the absence of exogenous TGF- β and induced nuclear accumulation of p-Smad2/3, activated Smad-dependent transcription with enhanced activity in reporter assays and increased levels of target genes such as PAI-1, Smad7 and type I collagens. In contrast, inactivation of S100A4 completely abrogated the stimulatory effects

of TGF- β on murine or human dermal fibroblasts. Although the molecular mechanisms, by which S100A4 regulates Smad-dependent transcription in SSc fibroblasts remain to be elucidated, recent findings in human embryonic kidney (HEK)-293T demonstrate that S100A4 can physically interact with Smad proteins in a calcium-dependent manner [45], suggesting that S100A4 may modulate DNA binding or cofactor recruitment of Smad-proteins. Together, these findings highlight the crucial regulatory effects of S100A4 on canonical TGF- β signaling and suggest that overexpression of S100A4 may contribute to aberrant TGF- β signaling in SSc.

Our results also demonstrate that inactivation of S100A4 exerts potent anti-fibrotic effects. Knockdown of S100A4 abrogates TGF- β / Smad-dependent transcription in cultured fibroblasts and prevents aberrant activation of canonical TGF- β signaling in murine models of SSc. The inhibition of canonical TGF- β signaling translates directly into inhibitory effects on fibroblast activation. Knockdown of S100A4 prevented the TGF- β -induced upregulation of type I collagen in cultured fibroblasts. Moreover, S100A4^{-/-} mice were protected from experimental fibrosis and showed reduced skin thickening, decreased accumulation of impaired differentiation of resting fibroblasts into myofibroblasts in two experimental models. The murine models used herein mimic different aspects of SSc. The mouse model of bleomycin-induced dermal fibrosis resembles inflammatory stages of SSc, in which fibroblasts are pre-dominantly activated by pro-fibrotic mediators released from infiltrating leukocytes [38, 46]. In contrast to bleomycin-induced fibrosis, Tsk-1 mice represent stages of SSc, in which inflammatory infiltrates have resolved and fibroblasts became endogenously activated [38, 47]. The potent anti-fibrotic effects of the silencing of S100A4 in both models indicate that S100A4 inhibition may be effective in inflammatory as well as in non-inflammatory subsets of SSc patients. Moreover, inactivation of S100A4 may not only be effective in models of skin fibrosis, but also in other fibrotic conditions such as pulmonary or

cardiac fibrosis [48, 49], highlighting that targeting of S100A4 maybe an interesting anti-fibrotic approach. This may particularly hold true as inactivation of S100A4 seems not to affect the physiologic collagen synthesis and targeting of S100A4 may thus theoretically not perturb the normal collagen homeostasis. Knockdown of S100A4 did not decrease the basal release of type I collagen from resting fibroblasts and S100A4^{-/-} mice display a normal architecture of the skin and of internal organs with comparable levels of collagen as in wildtype littermates. However, further studies are needed to assess the effects targeting S100A4 on tissue homeostasis.

In summary, we demonstrate that S100A4 is a key-regulator of fibroblast activation in SSc. S100A4 is induced by TGF- β and in turn amplifies the pro-fibrotic effects of canonical TGF- β / Smad signaling. Inactivation of S100A4 severely impairs TGF- β -induced fibroblast activation and ameliorates fibrosis in different mouse models. These findings have direct translational implications, because different approaches to target S100A4 are currently in clinical development with first promising results. Recently, blocking antibodies against S100A4 have been shown to ameliorate psoriasis in a human psoriasis xenograft SCID mouse model [22]. Furthermore, a transcriptional inhibitor of S100A4, calcimycin, inhibited colon cancer metastasis in a xenograft model [50].

Acknowledgements

We thank Maria Halter for excellent technical assistance.

Competing interests

O. Distler has consultancy relationships and/or has received research funding from Actelion, Pfizer, Ergonex, BMS, Sanofi-Aventis, United BioSource Corporation, medac, Biovitrium, Boehringer Ingelheim, Novartis, 4D Science and Active Biotech in the area of potential treatments of scleroderma; J.H.W. Distler has consultancy relationships and/or has received research funding from Actelion, Pfizer, Ergonex, BMS, Celgene, Bayer Pharma, Boehringer Ingelheim, JB Therapeutics, Sanofi-Aventis, Novartis, Array Biopharma and Active Biotech in the area of potential treatments of scleroderma and is stock owner of 4D Science GmbH.

Grant support

Grants DI 1537/4-1, DI 1537/5-1, DI 1537/7-1, BE 5191/1-1, AK 144/1-1 and SCHE 1583/7-1 of the Deutsche Forschungsgesellschaft, grant A40 of the IZKF in Erlangen, the ELAN-Program of the University of Erlangen-Nuremberg and the Career Support Award of Medicine of the Ernst Jung Foundation and the Ministry of Health of the Czech Republic (Research Project No. 00023728), SVV: 262512 and Research Project GAUK No. 3230/2011.

Copyright license statement

The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive license (or non-exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Group and co-owners or contracting owning societies (where published by the BMJ Group on their behalf), and its Licenses to permit this article (if

accepted) to be published in Annals of the Rheumatic Diseases and any other BMJ Group products and to exploit all subsidiary rights, as set out in our license.

REFERENCES

1. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009; **360**:1989-2003.
2. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest*. 2007; **117**:557-567.
3. Ebralidze A, Tulchinsky E, Grigorian M, et al. Isolation and characterization of a gene specifically expressed in different metastatic cells and whose deduced gene product has a high degree of homology to a Ca²⁺-binding protein family. *Genes Dev*. 1989; **3**:1086-1093.
4. Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001; **33**:637-668.
5. Klingelhofer J, Senolt L, Baslund B, et al. Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007; **56**:779-789.
6. Ambartsumian N, Klingelhofer J, Grigorian M, et al. The metastasis-associated Mts1(S100A4) protein could act as an angiogenic factor. *Oncogene*. 2001; **20**:4685-4695.
7. Schneider M, Kostin S, Strom CC, et al. S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2007; **75**:40-50.
8. Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer*. 2005; **92**:1955-1958.

9. Senolt L, Grigorian M, Lukanidin E, et al. S100A4 is expressed at site of invasion in rheumatoid arthritis synovium and modulates production of matrix metalloproteinases. *Ann Rheum Dis.* 2006; **65**:1645-1648.
10. Cerezo LA, Kuncova K, Mann H, et al. The metastasis promoting protein S100A4 is increased in idiopathic inflammatory myopathies. *Rheumatology (Oxford).* 2011; **50**:1766-1772.
11. Oslejskova L, Grigorian M, Gay S, Neidhart M, Senolt L. The metastasis associated protein S100A4: a potential novel link to inflammation and consequent aggressive behaviour of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Ann Rheum Dis.* 2008; **67**:1499-1504.
12. Bergmann C, Akhmetshina A, Dees C, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3beta induces dermal fibrosis by activation of the canonical Wnt pathway. *Ann Rheum Dis.* 2011; **70**:2191-2198.
13. Distler JH, Jungel A, Huber LC, et al. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2007; **56**:311-322.
14. LeRoy EC, Medsger TA, Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001; **28**:1573-1576.
15. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF-beta-mediated fibrosis. *Nat Commun.* 2012; **3**:735.
16. Dees C, Tomcik M, Palumbo-Zerr K, et al. JAK-2 as a novel mediator of the profibrotic effects of transforming growth factor beta in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2012; **64**:3006-3015.

17. Chen R, Huang C, Morinelli TA, Trojanowska M, Paul RV. Blockade of the effects of TGF-beta1 on mesangial cells by overexpression of Smad7. *J Am Soc Nephrol.* 2002; **13**:887-893.
18. Horn A, Palumbo K, Cordazzo C, et al. Hedgehog signaling controls fibroblast activation and tissue fibrosis in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2012; **64**:2724-2733.
19. Palumbo K, Zerr P, Tomcik M, et al. The transcription factor JunD mediates transforming growth factor {beta}-induced fibroblast activation and fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2011; **70**:1320-1326.
20. Kramer M, Dees C, Huang J, et al. Inhibition of H3K27 histone trimethylation activates fibroblasts and induces fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2013; **72**:614-620.
21. Lin NY, Beyer C, Giessel A, et al. Autophagy regulates TNFalpha-mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2013; **72**:761-768.
22. Zibert JR, Skov L, Thyssen JP, Jacobsen GK, Grigorian M. Significance of the S100A4 protein in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2010; **130**:150-160.
23. Dees C, Schlottmann I, Funke R, et al. The Wnt antagonists DKK1 and SFRP1 are downregulated by promoter hypermethylation in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2013 May 22.
24. Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, et al. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF-beta signalling to prevent fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2013 May 9.
25. Khodzhigorova A, Distler A, Lang V, et al. Inhibition of sumoylation prevents experimental fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2012; **71**:1904-1908.

26. Distler A, Deloch L, Huang J, et al. Inactivation of tankyrases reduces experimental fibrosis by inhibiting canonical Wnt signalling. *Ann Rheum Dis.* 2013; **72**:1575-1580.
27. EL Naaman C, Grum-Schwensen B, Mansouri A, Grigorian M, Santoni-Rugiu E, Hansen T, et al. Cancer predisposition in mice deficient for the metastasis-associated Mts1(S100A4) gene. *Oncogene.* 2004; **23**:3670-3680.
28. Reich N, Tomcik M, Zerr P, et al. Jun N-terminal kinase as a potential molecular target for prevention and treatment of dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2012; **71**:737-745.
29. Weingartner S, Zerr P, Tomcik M, et al. Pomalidomide is effective for prevention and treatment of experimental skin fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2012; **71**:1895-1899.
30. Dees C, Akhmetshina A, Zerr P, et al. Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J Exp Med.* 2011; **208**:961-972.
31. Horn A, Kireva T, Palumbo-Zerr K, et al. Inhibition of hedgehog signalling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2012; **71**:785-789.
32. Beyer C, Reich N, Schindler SC, et al. Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis.* 2012; **71**:1019-1026.
33. Beyer C, Schramm A, Akhmetshina A, et al. Beta-catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* 2012; **71**:761-767.
34. Dees C, Zerr P, Tomcik M, et al. Inhibition of Notch signaling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum.* 2011; **63**:1396-1404.

35. Palumbo-Zerr K, Horn A, Distler A, et al. Inactivation of fatty acid amide hydrolase exacerbates experimental fibrosis by enhanced endocannabinoid-mediated activation of CB1. *Ann Rheum Dis*. 2012; **71**:2051-2054.
36. Zerr P, Distler A, Palumbo-Zerr K, et al. Combined inhibition of c-Abl and PDGF receptors for prevention and treatment of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Am J Pathol*. 2012; **181**:1672-1680.
37. Zerr P, Palumbo-Zerr K, Distler A, et al. Inhibition of hedgehog signaling for the treatment of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2012; **120**:2909-2917.
38. Beyer C, Schett G, Distler O, Distler JH. Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum*. 2010; **62**:2831-2844.
39. LeRoy EC. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest*. 1974; **54**:880-889.
40. Xie R, Schlumbrecht MP, Shipley GL, Xie S, Bassett RL, Jr., Broaddus RR. S100A4 mediates endometrial cancer invasion and is a target of TGF-beta1 signaling. *Lab Invest*. 2009; **89**:937-947.
41. Kawakita T, Espana EM, Higa K, Kato N, Li W, Tseng SC. Activation of Smad-mediated TGF-beta signaling triggers epithelial-mesenchymal transitions in murine cloned corneal progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2013; **228**:225-234.
42. Beyer C, Schett G, Gay S, Distler O, Distler JH. Hypoxia. Hypoxia in the pathogenesis of systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2009; **11**:220.

43. Distler JH, Jungel A, Pilecky M, et al. Hypoxia-induced increase in the production of extracellular matrix proteins in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007; **56**:4203-4215.
44. Copple BL. Hypoxia stimulates hepatocyte epithelial to mesenchymal transition by hypoxia-inducible factor and transforming growth factor-beta-dependent mechanisms. *Liver Int.* 2010; **30**:669-682.
45. Matsuura I, Lai CY, Chiang KN. Functional interaction between Smad3 and S100A4 (metastatin-1) for TGF-beta-mediated cancer cell invasiveness. *Biochem J.* 2010; **426**:327-335.
46. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol.* 1999; **112**:456-462.
47. Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol.* 1976; **82**:493-512.
48. Lawson WE, Polosukhin VV, Zoia O, et al. Characterization of fibroblast-specific protein 1 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; **171**:899-907.
49. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med.* 2007; **13**:952-961.
50. Sack U, Walther W, Scudiero D, et al. S100A4-induced cell motility and metastasis is restricted by the Wnt/beta-catenin pathway inhibitor calcimycin in colon cancer cells. *Mol Biol Cell.* 2011; **22**:3344-3354.

Figure 1

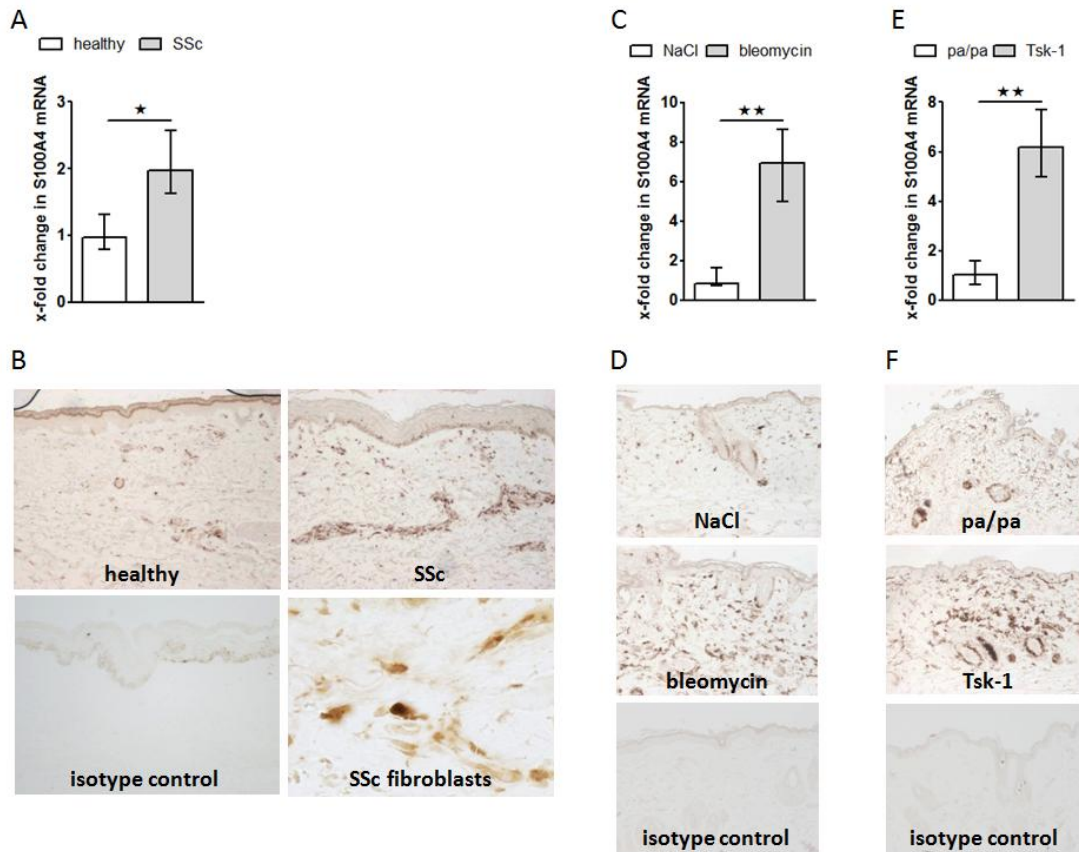


Figure 1: S100A4 is overexpressed in the skin of SSc patients and in experimental fibrosis

A: The mRNA levels of S100A4 are upregulated in SSc skin as compared to healthy skin (n = 6). **B:** Increased expression of S100A4 was detected in the papillary dermis of SSc patients (n = 10) as compared to healthy controls (n = 10). Representative images are shown at 200- and 1000-fold magnification. **C; D:** The mRNA (**C**) (n = 6) and protein (**D**) (n = 5) levels of S100A4 are increased in the fibrotic murine skin induced by subcutaneous injections of bleomycin as compared to sham-treated controls. **E; F:** The mRNA (**E**) (n = 6) and protein (**F**) (n = 5) levels of S100A4 are increased in the fibrotic skin of Tsk-1 mice as compared to their littermates lacking Tsk-1 mutation (pa/pa).

Figure 2

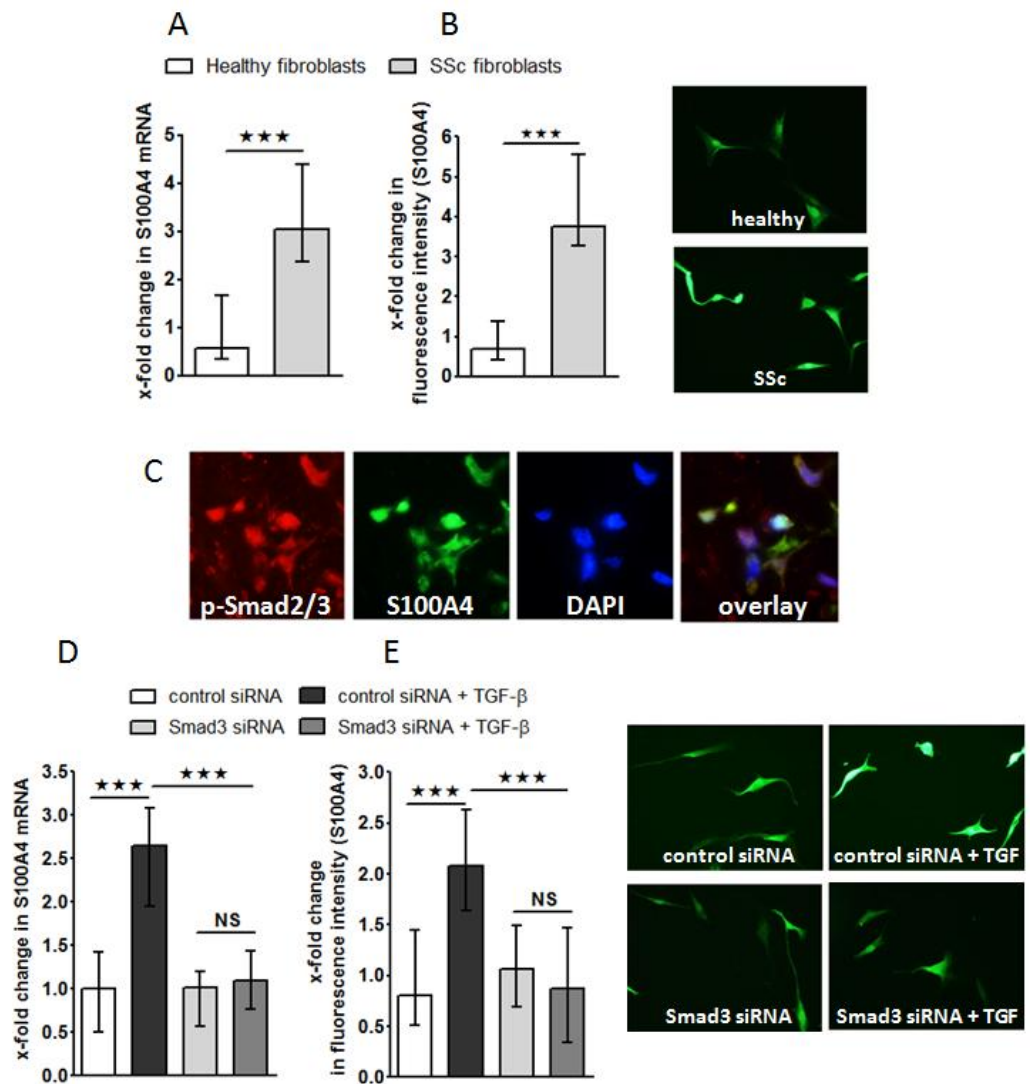


Figure 2: Canonical TGF- β signaling induces S100A4

A; B: The upregulation of S100A4 mRNA (**A**) ($n = 6$) and protein (**B**) ($n = 4$) persists in cultured SSc fibroblasts. **C:** S100A4 expression co-localizes with phosphorylated Smad2/3 (p-Smad2/3) in the skin of SSc patients. **D; E:** Stimulation of dermal fibroblasts with TGF- β increases the mRNA (**D**) ($n = 6$) and protein levels (**E**) ($n = 4$) of S100A4. The induction of S100A4 by TGF- β is prevented by siRNA-mediated knockdown of Smad3.

Figure 3

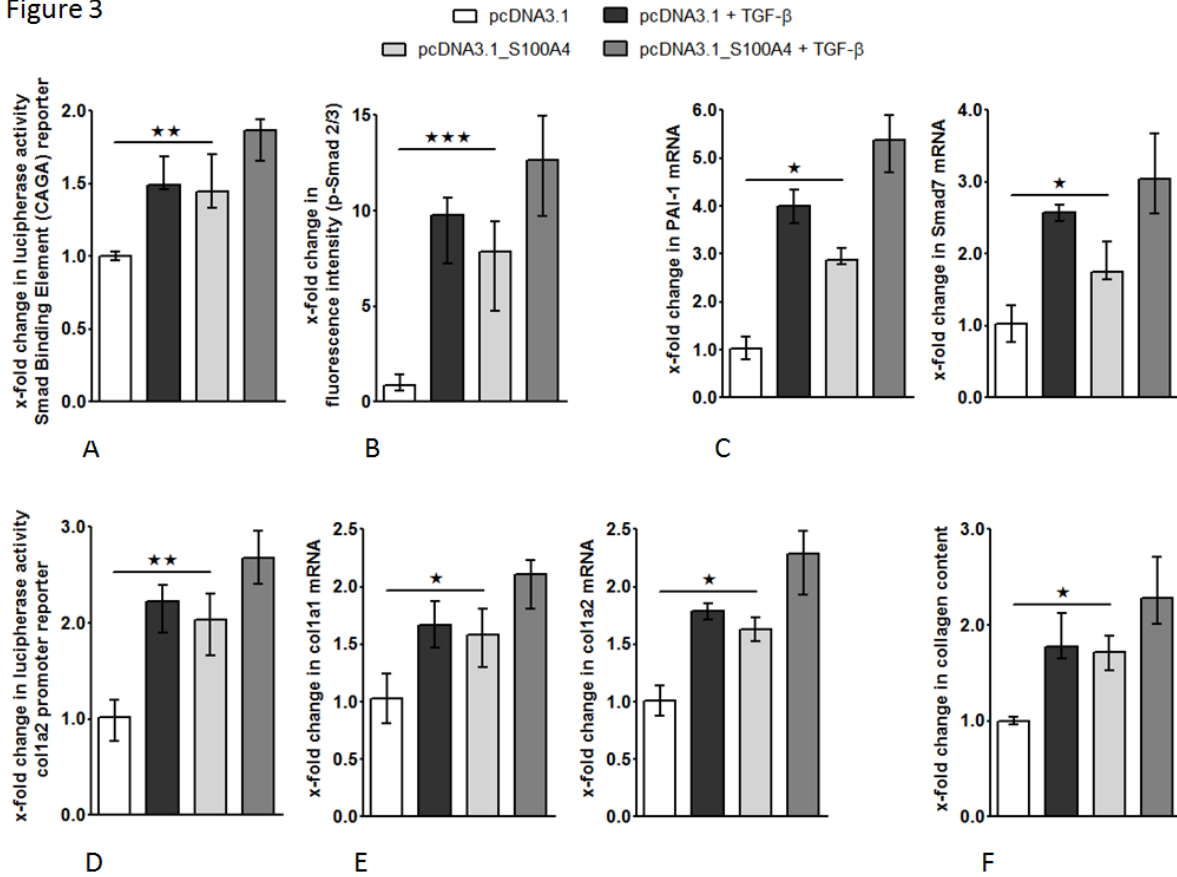


Figure 3: Overexpression of S100A4 activates TGF-β signaling and stimulates the release of collagen

A; B; C: Overexpression of S100A4 (pcDNA3.1_S100A4) stimulates the activity of Smad Binding Element (SBE) reporter constructs (**A**) (n = 9), induces an accumulation of phosphorylated Smad2/3 (p-Smad2/3) (**B**) (n = 4), and upregulates the mRNA levels of the prototypical TGF-β / Smad target genes PAI-1 and Smad7 (**C** for both) (n = 6 for both). **D; E; F:** Overexpression of S100A4 stimulates the activity of col1a2 reporter assays (**D**) (n = 9), increases the mRNA levels of col1a1 and col1a2 (**E** for both) (n = 6 for both), and upregulates the release of collagen protein (**F**) (n = 4).

Figure 4

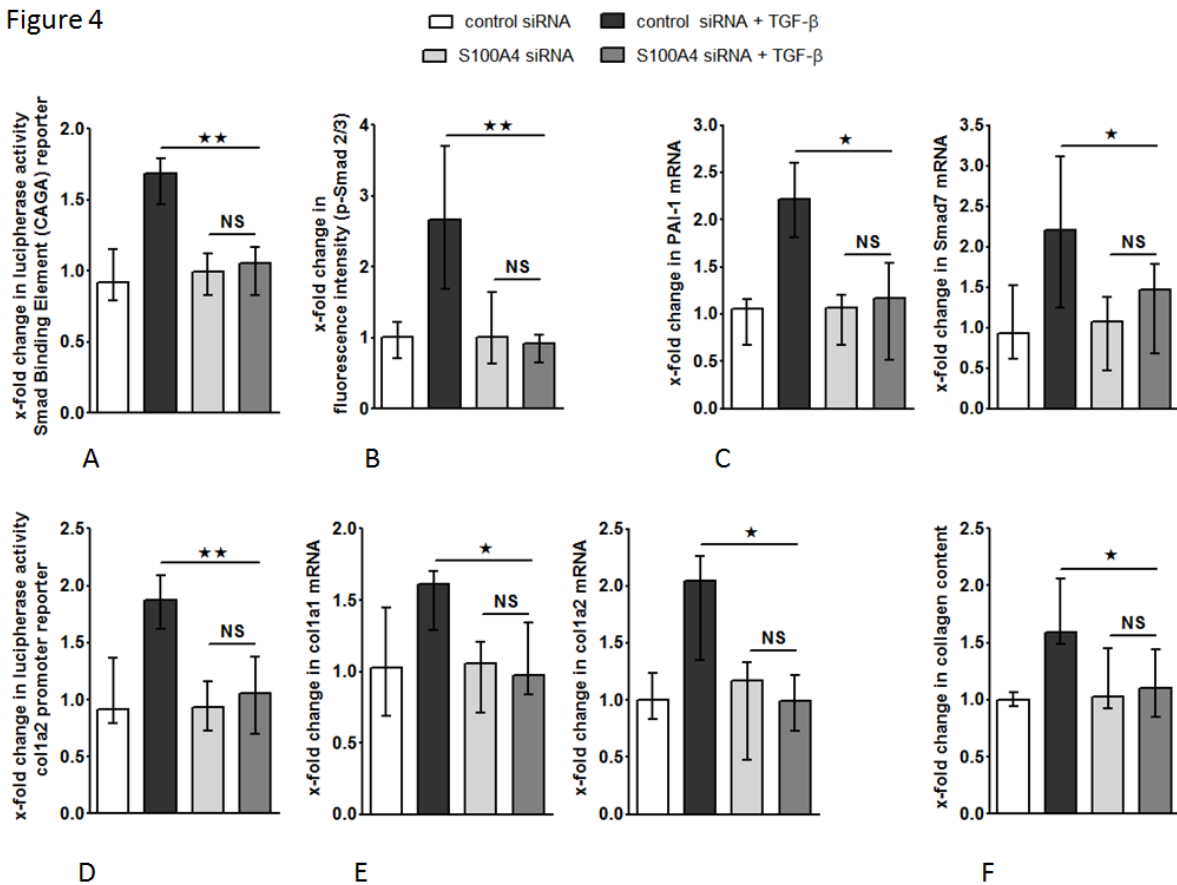


Figure 4: Inactivation of S100A4 inhibits canonical TGF-β signaling in fibroblasts

A; B; C: siRNA-mediated knockdown of S100A4 (S100A4 siRNA) reduces the stimulatory effects of TGF-β on SBE-reporter constructs (**A**) (n = 9), inhibits Smad2/3 phosphorylation (p-Smad2/3) (**B**) (n = 4), and prevents the induction of PAI-1 and Smad7 (**C** for both) (n = 6 for both) by TGF-β. **D; E; F:** Furthermore, knockdown of S100A4 abrogates the stimulatory effects of TGF-β on collagen synthesis with reduced activity of colla2 reporter assays (**D**) (n = 9), decreased mRNA levels of colla1 and colla2 (**E** for both) (n = 6 for both), and reduced collagen secretion (**F**) (n = 4).

Figure 5

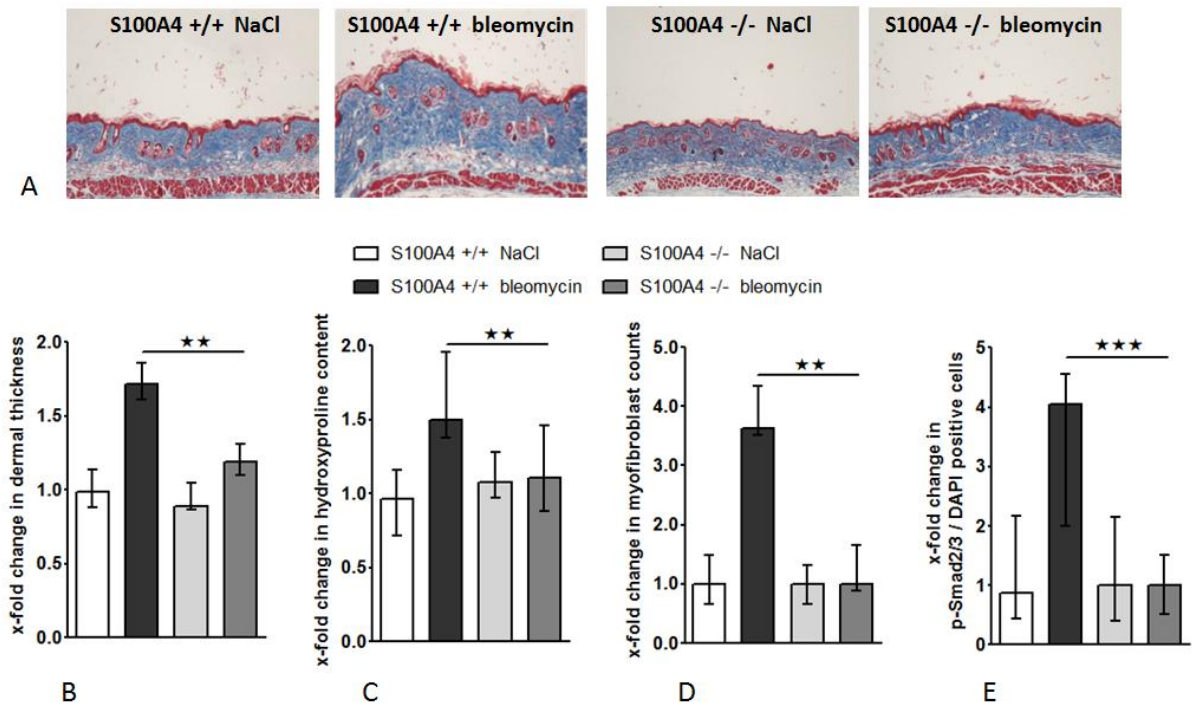


Figure 5: S100A4^{-/-} mice are protected from bleomycin-induced skin fibrosis

The pro-fibrotic effects of bleomycin are ameliorated in S100A4^{-/-} mice (A) with reduced dermal thickening (B), decreased hydroxyproline content (C), impaired myofibroblast differentiation (D) and reduced nuclear accumulation of p-Smad2/3 (E). Representative images of trichrome-stained sections are shown at 200-fold magnification in (A) (n = 9 for S100A4^{+/+} NaCl, n = 6 for S100A4^{+/+} bleomycin, n = 7 for S100A4^{-/-} NaCl, n = 6 for S100A4^{-/-} bleomycin).

Figure 6

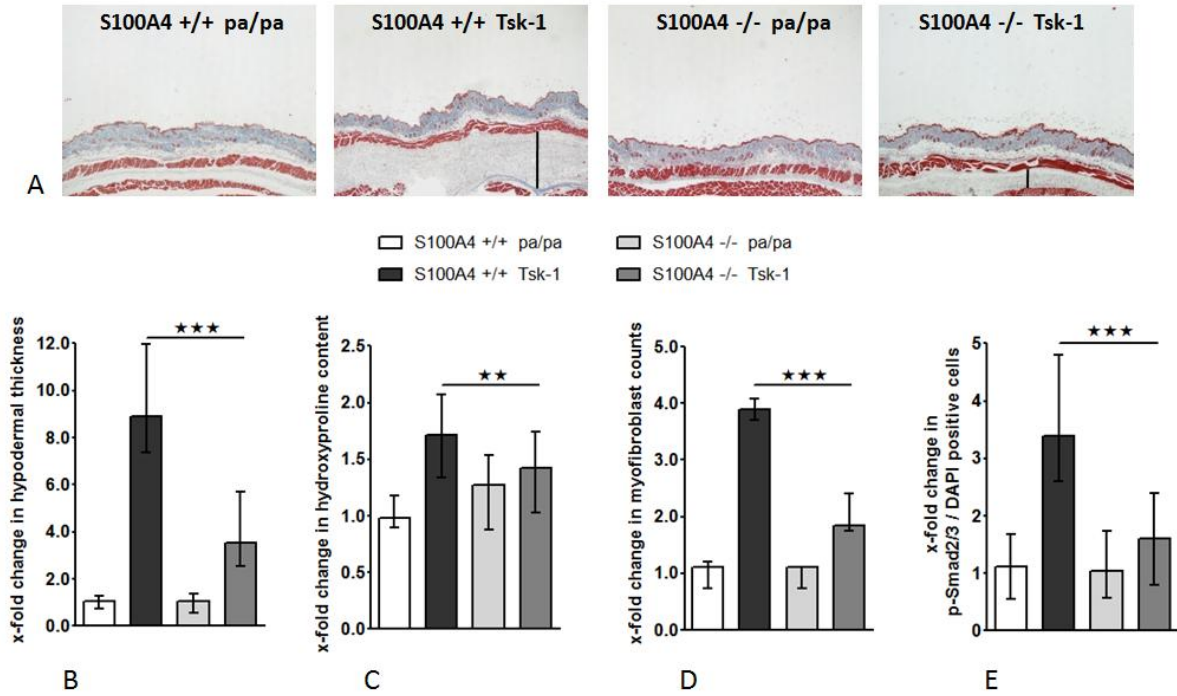
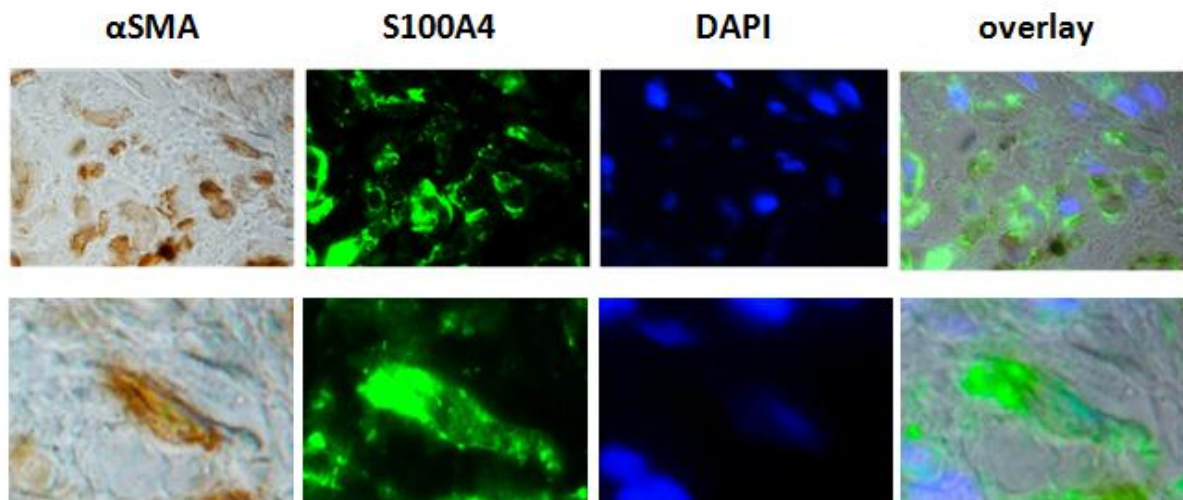


Figure 6: Deficiency in S100A4 ameliorates the Tsk-1 phenotype

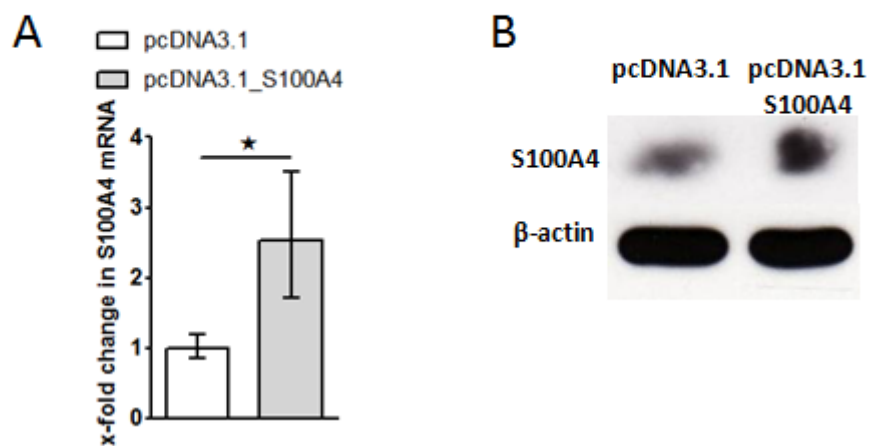
Fibrosis is reduced in S100A4^{-/-} Tsk-1 mice compared to S100A4^{+/+} Tsk-1 mice (A) with reduced hypodermal thickening (B), decreased hydroxyproline content (C), lower myofibroblast counts (D) and decreased nuclear accumulation of pSmad2/3 (E). Representative images of trichrome-stained sections are shown at 200-fold magnification in (A). (n = 10 for S100A4^{+/+} pa/pa, n = 8 for S100A4^{+/+} Tsk-1, n = 10 for S100A4^{-/-} pa/pa, n = 11 for S100A4^{-/-} Tsk-1).

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: αSMA positive myofibroblasts (brown) stain positive for S100A4 (green fluorescence staining) in SSc skin. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). One representative image is shown at 400- and 1000-fold magnification.

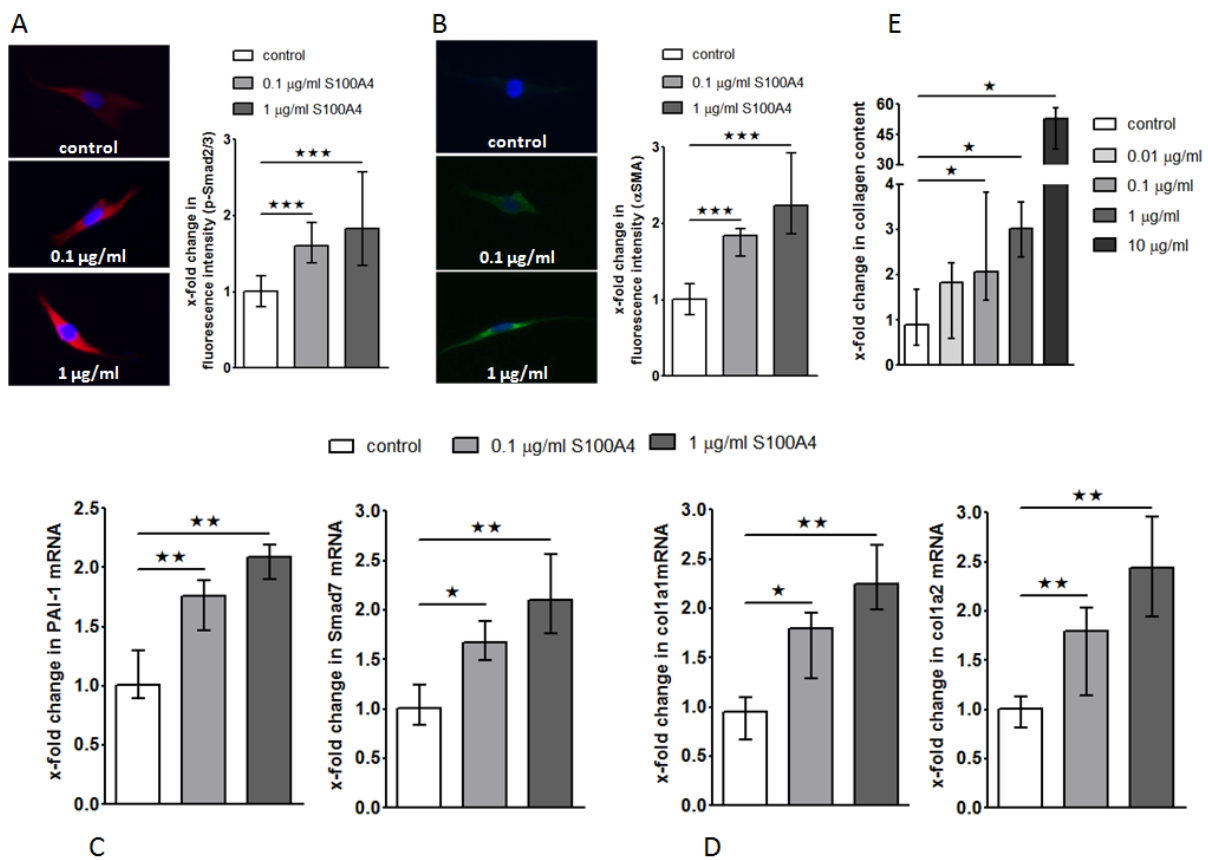
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2:

Increased expression of S100A4 mRNA (A) and protein (B) in fibroblasts transfected with pcDNA3.1_S100A4 expression vectors as compared to fibroblasts transfected with pcDNA3.1 control vectors (n = 6).

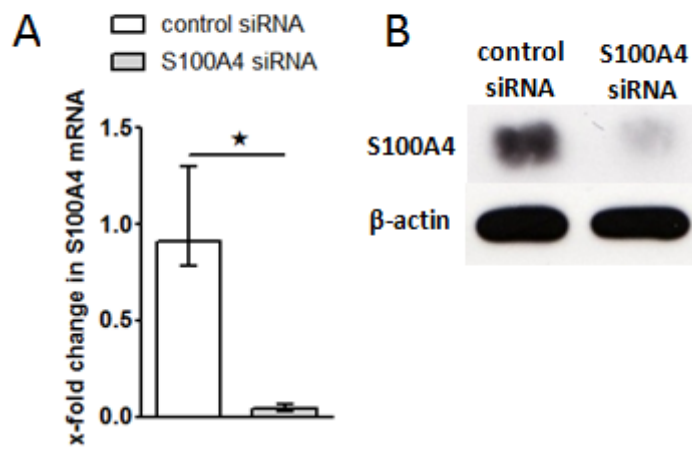
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3:

Stimulation of dermal fibroblasts with recombinant S100A4 protein induces accumulation of phosphorylated Smad2/3 (p-Smad2/3) (A), stimulates the expression of αSMA (B) (n = 4 for both), upregulates the mRNA levels of the prototypical Smad target genes PAI-1 and Smad7 (C) (n = 6), increases the mRNA expression of col1a1 and col1a2 (D) (n = 6), and enhances the release of collagen protein (E) (n = 4) in a dose-dependent manner.

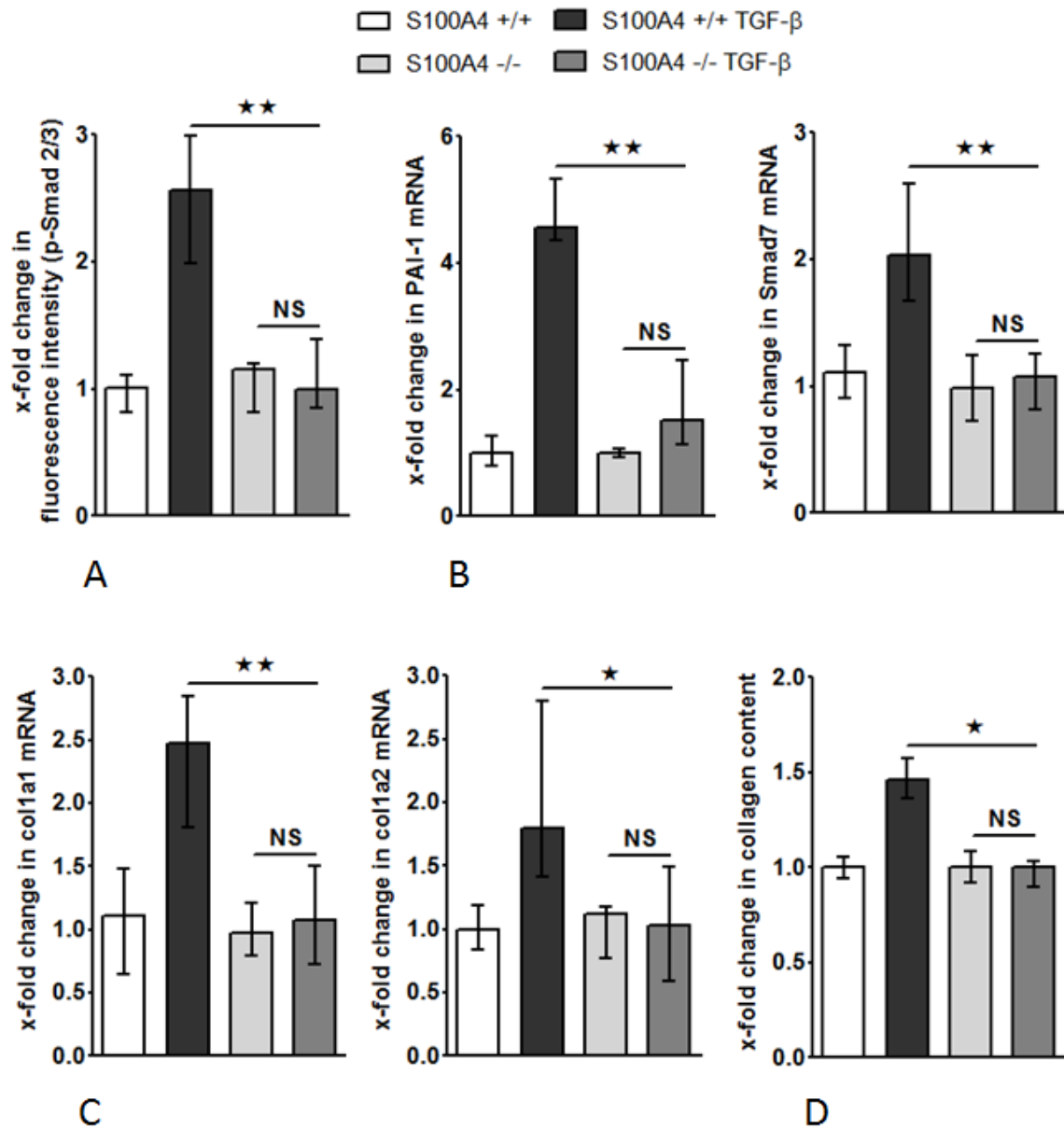
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4:

A; B: Decreased levels of S100A4 mRNA (**A**) and protein (**B**) upon transfection of fibroblasts with S100A4 siRNA (n = 6).

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5:

The stimulatory effects of TGF-β are abrogated in S100A4^{-/-} fibroblasts. In contrast to S100A4^{+/+} fibroblasts, incubation with TGF-β did not increase the levels of p-Smad2/3 (**A**) (n = 4), upregulate PAI-1 and Smad7 mRNA (**B**) (n = 6), increase the mRNA levels of col1a1 and col1a2 (**C**) (n = 6), or stimulate the secretion of collagen protein (**D**) (n = 4).

Supplementary Table 1: Primer sequences used for cloning of human S100A4 gene

Primer	Sequence (5'→3')
S100A4 fwd	GATCGGATCCATGGCGTGCCCTCTGGAGAAGG
S100A4 rev	GATCCTCGAGTCATTTCTTCCTGGGCTGCTTATCTGGG

Supplementary Table 2: The sequences of the used siRNAs

Primer	Sequence (5'→3')
S100A4 siRNA sense	UGUGUAACGAAUUCUUUGA
S100A4 siRNA antisense	UCAAAGAAUUCGUUACACA
ON-TARGETplus Human Smad3 siRNAs	CAACAGGAAUGCAGCAGUG
	GAGUUCGCCUUCAAUAUGA
	GGACGCAGGUUCUCCAAAC
	UUAGAGACAUCAAGUAUGG

Supplementary Table 3: Primer sequences used for quantitative real-time PCR

Primer	Sequence (5'→3')
human β -actin fwd	AGAAAATCTGGCACCACACC
human β -actin rev	TAGCACAGCCTGGATAGC
human S100A4 fwd	GATGAGCAACTTGGACAGCA
human S100A4 rev	ACTCTTGGAAGTCCACCTCGT
human colla1 fwd	TCAAGAGAAGGCTCACGATGG
human colla1 rev	TCACGGTCACGAACCACATT
human colla2 fwd	GGTCAGCACCACCGATGTC
human colla2 rev	CACGCCTGCCCTTCCTT
human PAI-1 fwd	TCATTGCTGCCCCTTATGA
human PAI-1 rev	GTTGGTGAGGGCAGAGAGAG
human Smad7 fwd	TACTCCAGATACCCGATGGATT
human Smad7 rev	TCTGGACAGTCTGCAGTTGG
murine β -actin fwd	TCTTTGATGTCACGCACGAT
murine β -actin rev	TACAGCTTCACCACCACA
murine S100A4 fwd	TGCATTCCAGAAGGTGATGA
murine S100A4 rev	CTTCATTGTCCCTGTTGCTGT
murine colla1 fwd	GAAGCACGTCTGGTTTGA
murine colla1 rev	ACTCGAACGGGAATCCATC
murine colla2 fwd	CCAACAAGCATGTCTGGTTAGGA
murine colla2 rev	TCAAACCTGGCTGCCACCAT
murine PAI-1 fwd	ACGTTGTGGAAGTCCCCTAC
murine PAI-1 rev	AGCGATGAACATGCTGAGG
murine Smad7 fwd	GCTCAATTCCGACAACAAGAG

murine Smad7 rev	TCTTGCTCCGCACTTTCTG
------------------	---------------------

Supplementary Table 4: Primer sequences used for genotyping of Tsk-1 and S100A4-deficient mice

Primer	Sequence (5'→3')
mutated fibrillin 1/Tsk-1 fwd	GTTGGCAACTATACCTGCAT
mutated fibrillin 1/Tsk-1 rev	CCTTTCCTGGTAACATAGGA
S100A4 knock-out allele fwd	GAGGTCCATCTCTTAGAGAGTTGGC
S100A4 knock-out allele rev	GCACATGTGCGAAGAAGCCAGAGTA
S100A4 wild-type allele fwd	CTGCCCTTAGGTCTCAACGGTTACC
S100A4 wild-type allele rev	CCTCCTCCTGCAGATGCATCACGTG

EXTENDED REPORT

Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition targets canonical TGF- β signalling to prevent fibrosis

Michal Tomcik,^{1,2} Pawel Zerr,¹ Jana Pitkowski,¹ Katrin Palumbo-Zerr,¹
Jérôme Avouac,^{1,3} Oliver Distler,⁴ Radim Becvar,² Ladislav Senolt,²
Georg Schett,¹ Jörg H Distler¹

Handling editor Tore K Kvien

¹Department of Internal Medicine 3 and Institute for Clinical Immunology, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

²First Faculty of Medicine, Department of Rheumatology, Institute of Rheumatology, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

³Rheumatology A Department and INSERM U1016 Cochin Hospital, Paris Descartes University, Paris, France

⁴Center of Experimental Rheumatology and Zurich Center of Integrative Human Physiology, University Hospital, Zurich, Switzerland

Correspondence to

Dr Michal Tomcik, First Faculty of Medicine, Department of Rheumatology, Institute of Rheumatology, Charles University, Na Slupi 4, 128 50 Prague 2, Czech Republic; michaltomcik@yahoo.com

Accepted 14 April 2013

ABSTRACT

Objectives Targeted therapies for systemic sclerosis (SSc) and other fibrotic diseases are not yet available. We evaluated the efficacy of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibition as a novel approach to inhibition of aberrant transforming growth factor (TGF)- β signalling and for the treatment of fibrosis in preclinical models of SSc.

Methods Expression of Hsp90 was quantified by quantitative PCR, western blot and immunohistochemistry. The effects of Hsp90 inhibition were analysed in cultured fibroblasts, in bleomycin-induced dermal fibrosis, in tight-skin (Tsk-1) mice and in mice overexpressing a constitutively active TGF- β receptor I (T β RI).

Results Expression of Hsp90 β was increased in SSc skin and in murine models of SSc in a TGF- β -dependent manner. Inhibition of Hsp90 by 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG) inhibited canonical TGF- β signalling and completely prevented the stimulatory effects of TGF- β on collagen synthesis and myofibroblast differentiation. Treatment with 17-DMAG decreased the activation of canonical TGF- β signalling in murine models of SSc and exerted potent antifibrotic effects in bleomycin-induced dermal fibrosis, in Tsk-1 mice and in mice overexpressing a constitutively active T β RI. Dermal thickness, number of myofibroblasts and hydroxyproline content were all significantly reduced on treatment with 17-DMAG. No toxic effects were observed with 17-DMAG at antifibrotic doses.

Conclusions Hsp90 is upregulated in SSc and is critical for TGF- β signalling. Pharmacological inhibition of Hsp90 effectively blocks the profibrotic effects of TGF- β in cultured fibroblasts and in different preclinical models of SSc. These results have translational implications, as several Hsp90 inhibitors are in clinical trials for other indications.

INTRODUCTION

The major hallmark of systemic sclerosis (SSc) is an excessive accumulation of extracellular matrix in affected organs.¹ The accumulation of extracellular matrix is caused by an increased release of collagen and other components of the extracellular matrix by pathologically activated fibroblasts.² Several lines of evidence suggest a central role of transforming growth factor β (TGF- β) in fibroblast activation and tissue fibrosis in SSc: TGF- β signalling is activated in SSc with nuclear accumulation of the downstream mediator Smad2/3 and increased transcription of TGF- β target genes.³ TGF- β potently activates fibroblasts and induces an expression profile in resting

normal fibroblasts that is reminiscent of SSc fibroblasts.⁴ Moreover, activation of TGF- β signalling—for example, by fibroblast-specific overexpression of constitutively active TGF- β receptor type I (T β RI)—is sufficient to induce fibrosis in mice.⁵ However, the knowledge of the crucial role of TGF- β in the pathogenesis of SSc has not yet been successfully translated into molecular therapies, and effective targeted treatments for fibrosis in SSc are still not available for clinical use.⁶

Heat shock proteins (Hsps) are a family of molecular chaperones. They were discovered by virtue of their induction in response to high temperature, but they are also upregulated by other forms of cellular stress.⁷ Functionally, most Hsps selectively recognise and bind non-native proteins under physiological and stress conditions, thereby Hsps prevent irreversible aggregation of proteins.⁸ However, Hsps have additional functions beyond prevention of protein aggregation. They not only modulate antigen processing and presentation to regulate immune responses,^{9–11} but they also interact with a broad variety of different kinases and transcription factors to regulate the cell cycle, apoptosis and cytoskeletal rearrangement.¹²

In this study, we evaluated Hsp90 as a potential target for the treatment of fibrosis in SSc. Hsp90 was selected because of its crucial role in folding and conformational stabilisation of TGF- β receptors (T β RI and T β RII)¹³ and also of Src kinases, which are intracellular mediators of the profibrotic effects of TGF- β .^{14–16} Inhibition of Hsp90 accelerates ubiquitination and increases proteasomal degradation of T β R and Src.¹³ Thus, inhibition of Hsp90 may be a novel approach to targeting TGF- β signalling. Of note, selective Hsp90 inhibitors from more than 10 different companies are currently being evaluated in clinical trials for their efficacy and tolerability in different oncological indications. Results from already completed trials suggest that pharmacological inhibition of Hsp90 is effective and not limited by toxicity.^{17–18} Thus, inhibition of Hsp90 has high translational potential, and various Hsp90 inhibitors would be available for clinical trials in SSc.

MATERIALS AND METHODS

Patients and fibroblast cultures

Fibroblast cultures were obtained from lesional skin biopsy samples from 15 patients with SSc and 12 healthy volunteers matched for age and sex. All

To cite: Tomcik M, Zerr P, Pitkowski J, et al. *Ann Rheum Dis* Published Online First: [please include Day Month Year] doi:10.1136/annrheumdis-2012-203095

Basic and translational research

patients fulfilled the criteria for SSc as suggested by LeRoy *et al.*¹⁹ All had diffuse cutaneous SSc. Additional information is provided in table 1. The study was approved by the ethics committee of the University of Erlangen-Nuremberg.

Fibroblast cultures from patients and healthy volunteers were cultured as described.²⁰ In selected experiments, fibroblasts were stimulated with TGF- β at a concentration of 10 ng/ml (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Germany).²¹

Quantitative real-time PCR

Gene expression was quantified by SYBR Green real-time PCR using the MxPro 3005P QPCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).^{21 22} The following primers were used: human Hsp90 β , 5'-ACCGCCCTGCTATCTTCTGG CTT-3' and 5'-GCATCCTCATCGCCCTCGAGAG-3'; human RPL27, 5'-ATCGCCAAGAGATCAAAGATAA-3' and 5'-TCT GAAGACATCCTTATTGACG-3'. Samples without enzyme in the reverse transcription reaction were used as controls. Human RPL27 was used to normalise for the amounts of cDNA within each sample.

Sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting

Proteins were separated by sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis as described.^{23 24} Primary antibodies against Hsp90 (sc-13119; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and β -actin (Sigma-Aldrich, Hamburg, Germany) and secondary horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG or rabbit anti-human IgG were used.

Immunofluorescence staining

HSP-90 β and phosphorylated (p)Smad2/3 in cultured fibroblasts were detected by incubation with monoclonal mouse anti-human Hsp-90 β antibodies (Assaydesigns, Ann Arbor, Michigan, USA) or polyclonal goat anti-human pSmad2/3 antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Polyclonal goat anti-mouse Alexa Fluor 488 antibodies (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Stress fibres were visualised with rhodamine-conjugated phalloidin (Sigma-Aldrich), and the cell nuclei were

stained using 4',6-diamidino-2-phenylindole (1:800; Santa Cruz Biotechnology). Images were captured at 200-fold magnification using a Nikon Eclipse 80i microscope (Nikon, Badhoevedorp, The Netherlands).

Immunohistochemistry staining

Formalin-fixed, paraffin-embedded skin sections were stained with mouse anti-human Hsp90 β or mouse anti-human α -smooth muscle actin (1:500; clone 1A4; Sigma-Aldrich) antibodies. Peroxidase-labelled species-specific immunoglobulins (Dako, Glostrup, Denmark) were used as secondary antibodies, and isotype-matched antibodies were used as controls.

Quantification of soluble collagen in cell culture supernatants

Soluble collagen in cell culture supernatants was quantified using the SirCol collagen assay (Biocolor, Belfast, Northern Ireland) as described.²⁵

T β RI-induced dermal fibrosis

Injection of replication-deficient adeno-associated virus (AAVs) encoding constitutively active T β RI (AdTBR) into the skin of mice induces dermal fibrosis.^{26 27} AdTBR or AdLacZ (6.7×10^7 infectious units (ifu)/ml) was injected intracutaneously into defined areas of the upper back of 4-week-old FVB mice at day 1 and day 28. Treatment with 17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG; 5 mg/ml in phosphate-buffered saline; InvivoGen, San Diego, California, USA) was started at day 1 and continued every third day for 8 weeks. After 8 weeks, mice were killed, and dermal thickness, number of myofibroblasts and hydroxyproline content were analysed as described.^{24 28–31}

Bleomycin-induced dermal fibrosis

Skin fibrosis was induced in 6-week-old DBA/2J mice by local injection of bleomycin every other day for 4 weeks.^{30 32} One group of mice challenged with bleomycin was intraperitoneally injected with 100 μ l 17-DMAG every third day for 4 weeks. The control NaCl- and bleomycin-treated groups were injected intraperitoneally with 100 μ l phosphate-buffered saline every third day for 4 weeks.

Tsk-1 mouse model of dermal fibrosis

The tight-skin (Tsk-1) phenotype is induced by a dominant mutation in the fibrillin-1 gene, which results in increased activation of latent TGF- β .³³ TSK-1 mice were interbred with pa/pa mice, in which a recessive mutation (pa) induces a light grey color of the fur and pink eyes. Because the fibrillin 1 gene is genetically linked to the pa gene, mice can be prescreened for the *tsk1* mutation based on the color of their fur and eyes. All mice with black fur and eyes carry the dominant *tsk1* mutation and are heterozygous for the pale mutation. In contrast, mice with light grey fur do not carry the *tsk1* mutation but are homozygous for the mutated pale gene. Apart from the change in skin color, the pale mutation itself does not alter skin physiology or fibrogenesis.³⁴ Treatment with 17-DMAG was started at the age of 5 weeks, and mice were killed after 5 weeks of treatment.

Statistical analysis

All data are presented as median with IQR, and differences between the groups were tested for their statistical significance by non-parametric Mann–Whitney U test. A p value of less than 0.05 was considered significant.

Table 1 Clinical characteristics of patients with systemic sclerosis (SSc) at date of biopsy

Characteristic	Value
Gender (F/M)	11/4
Age (years), median (range)	52 (35–78)
Disease duration (years), median (range)	5 (0.5–11)
ANA positive	15/15
Anti-topoisomerase positive	6/15
Pulmonary fibrosis	5/15
Myocardial involvement	2/15
Pulmonary arterial hypertension	3/15
Digital ulcers	8/15
Active disease	7/15
Medication	No DMARDs, corticosteroids or NSAIDs

All patients had diffuse cutaneous SSc. The disease subset was determined according to the criteria proposed by LeRoy *et al.*¹⁹ Disease duration was measured from the onset of the first non-Raynaud symptoms attributable to SSc. Pulmonary arterial hypertension was diagnosed by right heart catheterisation. Disease activity was determined using the EULAR Systemic Sclerosis Activity Score. Patients with scores of ≥ 3 were classified as having active disease. DMARD, disease-modifying antirheumatic drug; F, female; M, male; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug.

RESULTS

Hsp90 β is upregulated in SSc fibroblasts

Hsp90 β was induced in the skin of patients with SSc compared with healthy individuals (figure 1A). In healthy volunteers, Hsp90 β was either undetectable (3/8 individuals) or expressed at low levels with faint staining of the dermis (5/8 individuals). In contrast, prominent staining for Hsp90 β was detected in fibroblasts of the upper dermal layer of all patients with SSc (figure 1A). Keratinocytes and endothelial cells also stained positive for Hsp90 β in three out of eight and six out of eight patients, respectively. Of particular interest, expression of Hsp90 β in fibroblasts colocalised with expression of α -smooth muscle actin (data not shown). Indeed, all myofibroblasts stained intensely for Hsp90 β in SSc skin. Although not statistically significant, the mRNA levels of Hsp90 β tended to be higher in patients with high disease activity as indicated by a European League Against Rheumatism (EULAR) Systemic Sclerosis Activity Score ≥ 3 (increase of 22%, $p=0.10$). No differences were observed between patients with and without antibodies to topoisomerase. However, further studies on larger patient collectives are needed to determine differences in Hsp90 expression between different subgroups of patients with diffuse cutaneous SSc.

Consistent with the findings in human SSc, Hsp90 β was also induced in the mouse model of bleomycin-induced fibrosis and in Tsk-1 mice (figure 1B,C).

We next analysed whether the upregulation of Hsp90 β in SSc is due to increased TGF- β . The basal mRNA and protein levels of Hsp90 in the absence of exogenous stimulation were increased in cultured SSc fibroblasts compared with fibroblasts from healthy individuals. Consistent with persistent activation of TGF- β signalling in cultured SSc fibroblasts, the stimulatory effects of TGF- β on Hsp90 mRNA and protein were more pronounced in fibroblasts from healthy individuals than in SSc fibroblasts (figure 1D,E). The stimulatory effects of TGF- β signalling on Hsp90 β were confirmed in vivo. Activation of TGF- β signalling by overexpression of a constitutively active T β RI upregulated the expression of Hsp90 β in murine skin (figure 1F).

Inhibition of Hsp90 abrogates the stimulatory effects of TGF- β on fibroblasts

We next evaluated whether Hsp90 regulates the profibrotic effects of TGF- β . We first analysed whether the selective Hsp90 inhibitor, 17-DMAG, prevents the nuclear accumulation of pSmad2/3 on stimulation with TGF- β . Indeed, treatment with

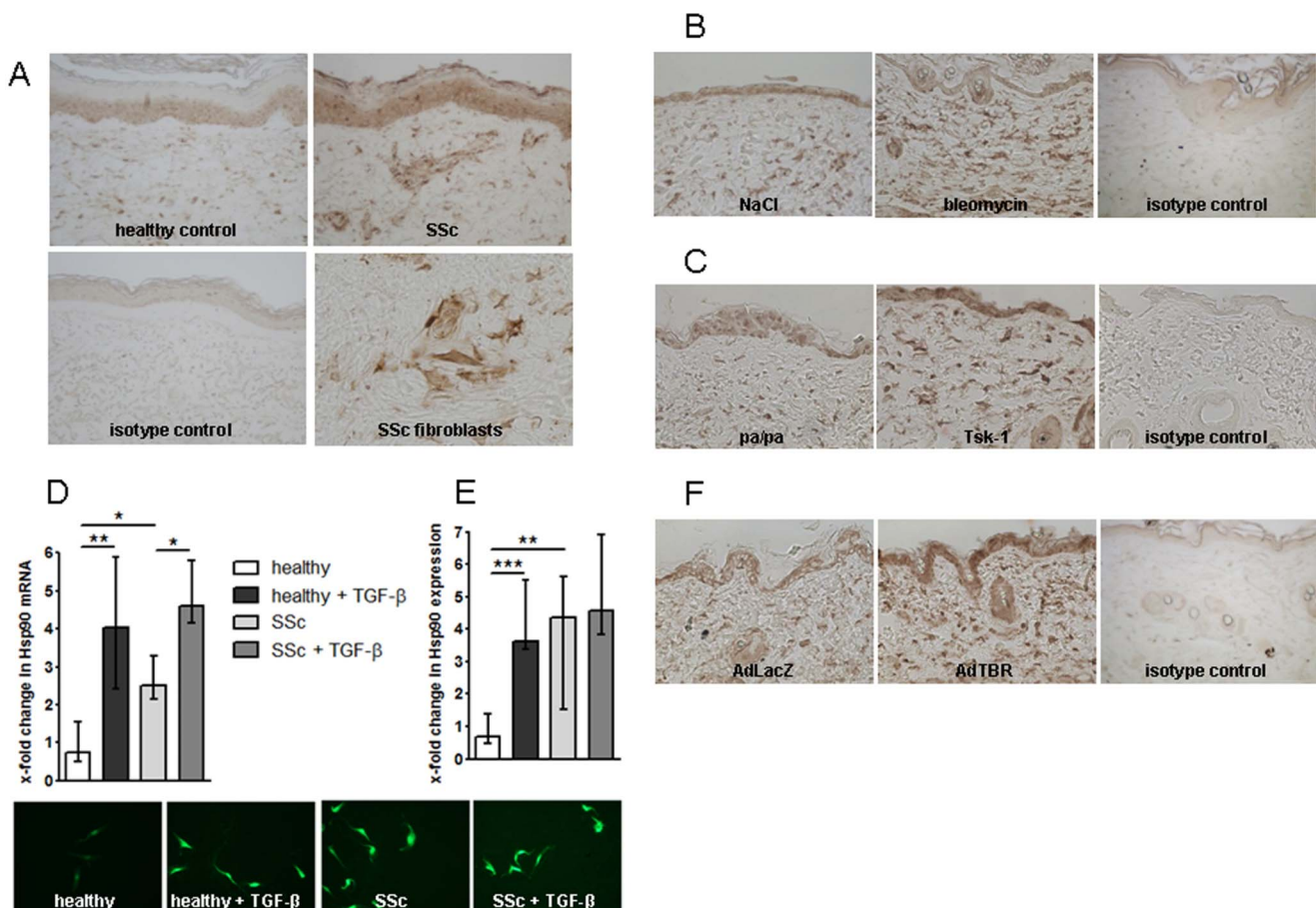


Figure 1 Heat shock protein 90 (Hsp90) is increased in patients with systemic sclerosis (SSc) and in experimental fibrosis in a transforming growth factor β (TGF- β)-dependent manner. Increased expression of Hsp90 β was detected by immunohistochemistry in the upper layer of the dermis of patients with SSc as shown in representative images at 200-fold magnification (A). The levels of Hsp90 β are also upregulated in bleomycin-induced skin fibrosis (B) and in Tsk-1 mice (C). The stimulatory effects of TGF- β on Hsp90 mRNA (D) and protein levels (E) are more pronounced in fibroblasts from healthy individuals than in fibroblasts from patients with SSc. The expression of Hsp90 β is also increased in the skin of mice infected with adenovirus overexpressing constitutively active TGF- β receptor I (AdTBR) compared with mice infected with LacZ virus as shown in the representative images at 400-fold magnification (F). p Values are expressed as follows: $0.05 > p > 0.01$ as *; $0.01 > p > 0.001$ as **; $p < 0.001$ as ***. All data are presented as median with interquartile range (IQR). This figure is only reproduced in colour in the online version.

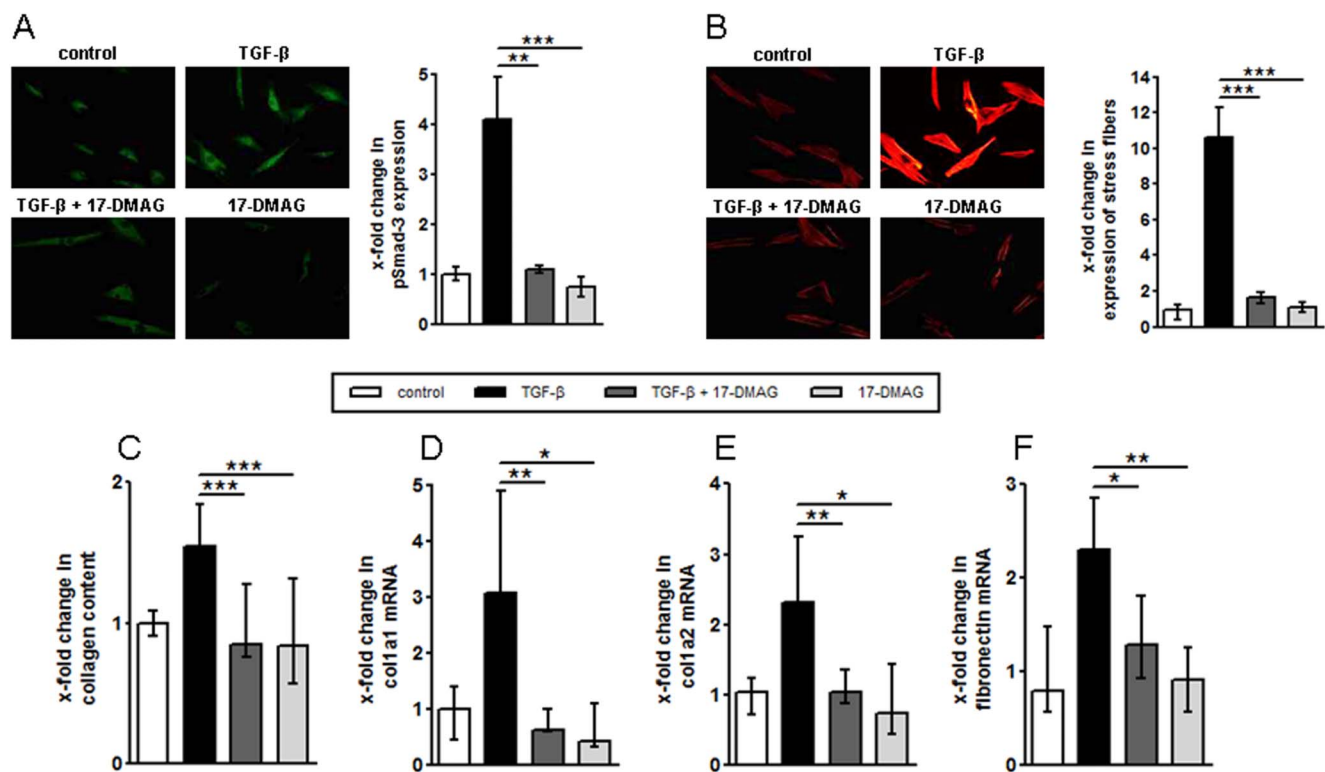


Figure 2 Inhibition of heat shock protein 90 (Hsp90) abrogates stimulatory effects of transforming growth factor β (TGF- β) on collagen release in fibroblasts. 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG) inhibited canonical Smad signalling and prevented accumulation of phosphorylated (p)Smad2/3 (A). 17-DMAG reduced the stimulatory effects of TGF- β on stress fibre formation (B), on the release of collagen protein (C) and on the mRNA levels of col1a1 (D), col1a2 (E) and fibronectin (F). Number of cell lines per experiment: four for A, B and nine for C–F. p values are expressed as follows: 0.05 > p > 0.01 as *; 0.01 > p > 0.001 as **; p < 0.001 as ***. All data are presented as median with interquartile range (IQR). This figure is only reproduced in colour in the online version.

17-DMAG abrogated the nuclear accumulation of pSmad2/3 in TGF- β -stimulated fibroblasts ($p < 0.01$) (figure 2A). Formation of stress fibres is a hallmark of myofibroblasts and is induced by TGF- β . Preincubation with 17-DMAG prevented the TGF- β -induced formation of stress fibres ($p < 0.001$) (figure 2B). Moreover, 17-DMAG effectively inhibited the stimulatory effects of TGF- β on the collagen synthesis in dermal fibroblasts. The TGF- β -induced increase in secreted collagen protein and mRNA levels of col1a1 and col1a2 was completely abrogated ($p < 0.001$, $p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively) (figure 2C–E). In addition, the mRNA levels of fibronectin were decreased by 72% in 17-DMAG-treated cells compared with sham-treated fibroblasts stimulated with TGF- β ($p < 0.05$) (figure 2F).

Inhibition of Hsp90 prevents fibrosis induced by overexpression of T β RI

After demonstrating that Hsp90 inhibition reduces the profibrotic effects of TGF- β in vitro, we next aimed to confirm these findings in vivo. We thus evaluated the effects of 17-DMAG in the mouse model of T β RI-driven fibrosis, in which fibrosis is induced by selective activation of TGF- β signalling.³³ Inhibition of Hsp90 exerted potent antifibrotic effects in AdTBR mice (figure 3A–E). Treatment with 17-DMAG reduced dermal thickening by 81% compared with sham-treated AdTBR mice ($p < 0.001$) (figure 3A,B). Hydroxyproline content and myofibroblast count were also significantly decreased by 88% ($p < 0.05$) and 69% ($p < 0.01$), respectively, on treatment with 17-DMAG (figure 3C,D).

The antifibrotic effects of Hsp90 inhibition were accompanied by potent inhibition of canonical TGF- β . The nuclear accumulation of pSmad2/3 was reduced by 55% in 17-DMAG-treated AdTBR mice compared with sham-treated AdTBR mice ($p < 0.001$) (figure 3E).

Treatment with 17-DMAG protects from bleomycin-induced fibrosis

To further evaluate the antifibrotic potential of the Hsp90 inhibitor in vivo, we used the mouse model of bleomycin-induced dermal fibrosis, which serves as a model for early, inflammatory stages of SSc.³³ Treatment with 17-DMAG reduced dermal thickening by 56% ($p < 0.001$ compared with sham-treated, bleomycin-challenged mice) (figure 4A,B). Furthermore, the hydroxyproline content in lesional skin was reduced by 81% ($p < 0.05$) (figure 4C). The differentiation of resting fibroblasts into myofibroblasts was reduced by 65% ($p < 0.001$) compared with sham-treated, bleomycin-challenged mice (figure 4D). Hsp90 inhibition effectively reduced canonical TGF- β signalling with a 74% decrease in the number of cells positive for pSmad2/3 ($p < 0.001$) (figure 4E).

Inhibition of Hsp90 ameliorates fibrosis in Tsk-1 mice

To confirm the antifibrotic effects of Hsp90 inhibition in another, less inflammatory mouse model that resembles later, non-inflammatory stages of fibrosis,^{33 34} Tsk-1 mice were treated with 17-DMAG. Inhibition of Hsp90 reduced hypodermal thickening in Tsk-1 mice by 76% compared with sham-treated Tsk-1 mice ($p < 0.001$) (figure 5A,B). Hydroxyproline

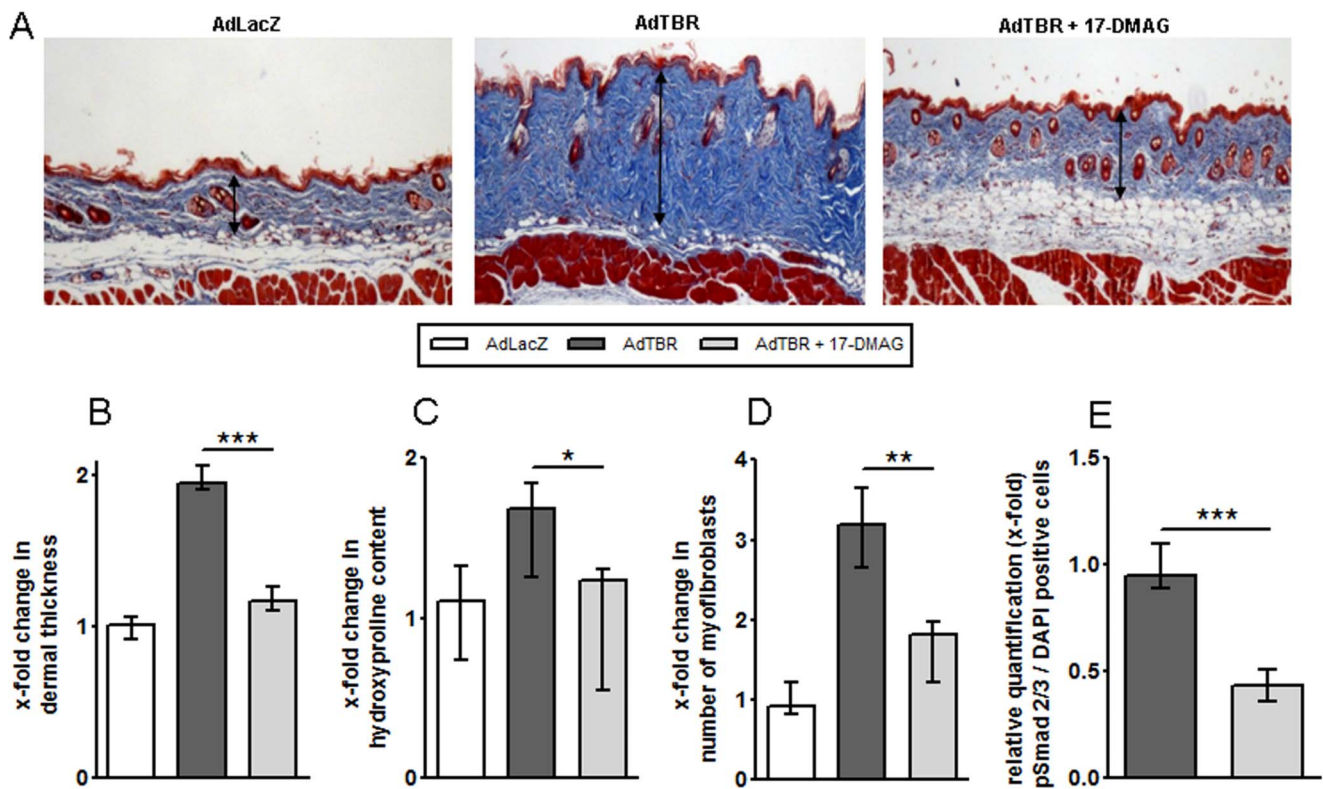


Figure 3 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG) prevents AdTBR-induced skin fibrosis. Inhibition of heat shock protein 90 (Hsp90) reduced dermal thickening (A, B), hydroxyproline content (C) and numbers of myofibroblasts (D) in AdTBR mice. 17-DMAG reduced transforming growth factor β (TGF- β) signalling as shown by reduced nuclear accumulation of phosphorylated (p)Smad2/3 (E). Representative images of trichrome-stained sections are shown at 100-fold magnification. Seven mice were used for each group (AdLacZ, AdTBR, AdTBR+17-DMAG). p values are expressed as follows: $0.05 > p > 0.01$ as *; $0.01 > p > 0.001$ as **; $p < 0.001$ as ***. All data are presented as median with interquartile range (IQR). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. This figure is only reproduced in colour in the online version.

content and myofibroblast count were also reduced by 67% ($p < 0.05$) and 85% ($p < 0.001$), respectively, in Tsk-1 mice treated with 17-DMAG (figure 5C,D). Similar to previous models, 17-DMAG inhibited canonical TGF- β signalling and reduced the number of cells with nuclear pSmad2/3 by 49% ($p < 0.001$) compared with sham-treated Tsk-1 mice (figure 5E). To exclude the possibility that the antifibrotic effects of 17-DMAG are accompanied by major toxic side effects, mice in all models were closely monitored during the treatment. No clinical signs of toxicity were observed, and the mean body weight, activity of the mice and texture of the fur were not altered in mice treated with antifibrotic doses of 17-DMAG for up to 8 weeks. Moreover, gross macroscopic evaluation of the mice on necropsy revealed no signs of toxicity (data not shown).

DISCUSSION

We demonstrate in this study that inhibition of Hsp90 abrogates the profibrotic effects of TGF- β signalling. Incubation of cultured fibroblasts with 17-DMAG prevented the nuclear accumulation of pSmad2/3, inhibited the differentiation of resting fibroblasts into myofibroblasts and completely abrogated the stimulatory effects of TGF- β on the release of extracellular matrix in vitro. Pharmacological inhibition of Hsp90 also effectively attenuated TGF- β signalling in vivo and significantly reduced skin fibrosis induced by overexpression of a constitutively active T β RI. Hsp90 is required for correct folding and conformational stabilisation of T β Rs and Src kinases.¹³ Although we did not directly measure the activity of Hsp90 in fibrotic skin, the potency of the effects of Hsp90 inhibition with

complete abrogation of the profibrotic effects of TGF- β signalling in vitro and the efficacy of 17-DMAG in short-term experiments suggest that Hsp90 controls TGF- β signalling in fibroblasts also via other mechanisms in addition to conformational stabilisation. Indeed, Hsps have been recently suggested to directly affect the activity of kinases. In this context, JNK1/2 and JAK2 kinases may be interesting candidates as mediators of the effects of Hsp90 on TGF- β signalling, because (i) they have been shown to be regulated by Hsp90^{35, 36} and (ii) they are established downstream mediators of the profibrotic effects of TGF- β in fibroblasts.^{28, 37} However, further studies on Hsp90 activity and on its effects on JNK and JAK kinases are needed to elucidate how Hsp90 regulates TGF- β signalling in fibroblasts.

Hsp90 is overexpressed in patients with SSc and in murine models of skin fibrosis. The upregulation of Hsp90 in AdTBR mice suggests that increased TGF- β signalling may be an important factor for the upregulation of Hsp90 in fibrosis. TGF- β stimulated the transcription and increased the protein levels of Hsp90 β in cultured fibroblasts. Increased TGF- β signalling also stimulated the expression of Hsp90 β in fibroblasts in murine skin. As Hsp90 is required for effective TGF- β signalling, Hsp90 serves as an intracellular amplifier of the profibrotic effects of TGF- β in SSc. TGF- β increases the expression of Hsp90, which in turn renders fibroblasts more susceptible to TGF- β signalling by stabilising TGF- β cell surface receptors and intracellular downstream mediators such as Src, JNK and JAK kinases. The disruption of this endogenous amplification loop and the interference with TGF- β signalling

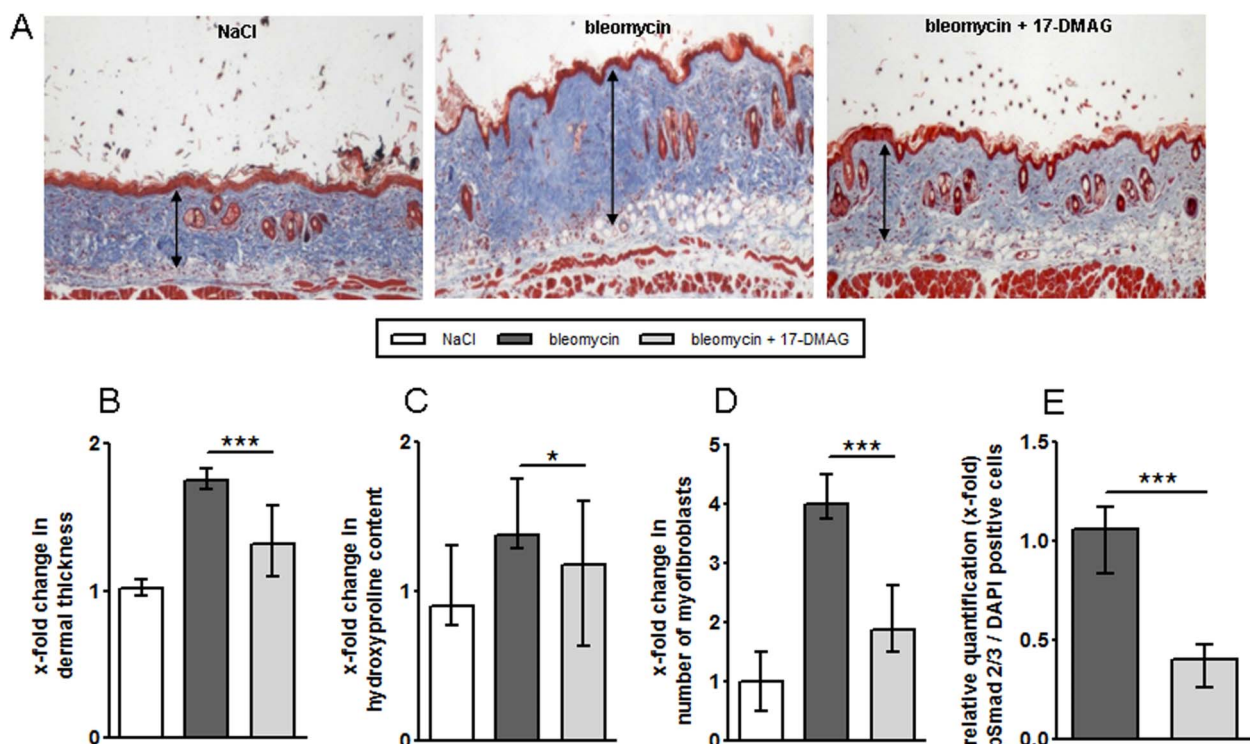


Figure 4 Inhibition of heat shock protein 90 (Hsp90) reduced bleomycin-induced fibrosis. Treatment with 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG) prevents dermal thickening (A, B), accumulation of hydroxyproline (C) and myofibroblast differentiation (D) and reduces the nuclear accumulation of phosphorylated (p)Smad2/3 (E) in bleomycin-challenged mice. Representative images of trichrome-stained sections are shown at 100-fold magnification. Number of mice used: NaCl, ¹²; bleomycin, ⁹; bleomycin+17-DMAG, ⁹. p values are expressed as follows: 0.05>p>0.01 as *; p<0.001 as ***. All data are presented as median with interquartile range (IQR). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole. This figure is only reproduced in colour in the online version.

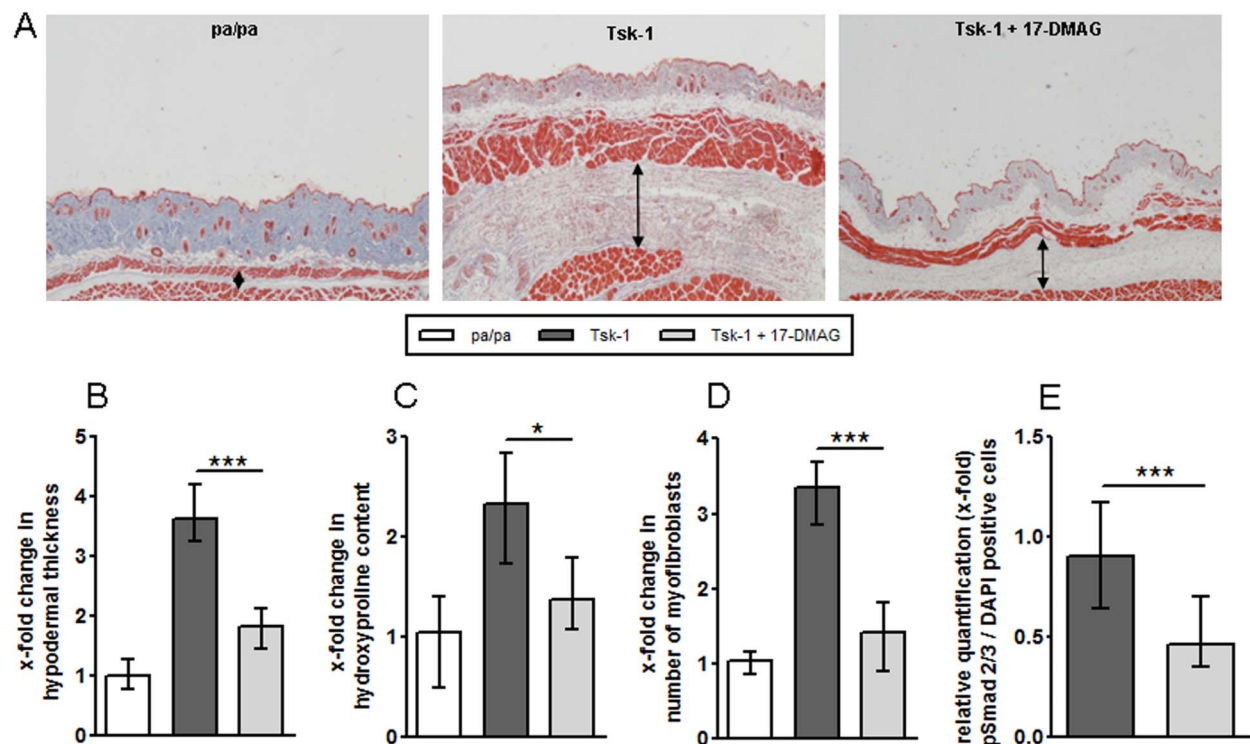


Figure 5 17-Dimethylaminoethylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17-DMAG) reduces fibrosis in the Tsk-1 mouse model. Pharmacological inhibition of heat shock protein 90 (Hsp90) by 17-DMAG reduces hypodermal thickening (A, B), decreases the hydroxyproline content (C), inhibits myofibroblast differentiation (D) and prevents nuclear accumulation of phosphorylated (p)Smad2/3 (E) in Tsk-1 mice. Representative images of trichrome-stained sections are shown at 40-fold magnification. Number of mice used: pa/pa, ⁷; Tsk-1, ⁶; Tsk-1+17-DMAG, ⁶. p values are expressed as follows: 0.05>p>0.01 as *; p<0.001 as ***. All data are presented as median with interquartile range (IQR). DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

on multiple levels may explain the potent antifibrotic effects of Hsp90 inhibitors.

We demonstrated that pharmacological inhibition of Hsp90 strongly inhibits TGF- β signalling as a core pathway of fibrosis in vitro and in vivo. The inhibitory effects on TGF- β signalling translate into potent antifibrotic effects. Treatment with the Hsp90 inhibitor, 17-DMAG, significantly reduced histological features of fibrosis, decreased collagen content and prevented the differentiation of resting fibroblasts into myofibroblasts in three different mouse models in pharmacologically relevant doses. The mouse models used herein mimic different stages and aspects of SSc. The mouse model of bleomycin-induced dermal fibrosis resembles early, inflammatory stages of SSc, in which fibroblasts are predominantly activated by profibrotic mediators released from infiltrating leucocytes.^{33–38} In contrast, Tsk-1 mice represent later stages of SSc, in which inflammatory infiltrates have already resolved and fibroblasts have become endogenously activated.^{33–39} In addition, the Tsk-1 model also highlights the key role of B cells in SSc.⁴⁰ The AdTBR model is independent of inflammation, and fibrosis is exclusively driven by enhanced TGF- β signalling in fibroblasts.^{5–33} The potent antifibrotic effects of 17-DMAG in all of these models indicate that Hsp90 inhibition may be effective in different fibrotic conditions and at different stages of SSc. Of note, antifibrotic doses of 17-DMAG were well tolerated and toxic effects were neither observed by clinical monitoring nor on necroscopic evaluation. The tolerability of Hsp90 inhibitors has been further evaluated by numerous clinical trials with different Hsp90 inhibitors for various oncological indications during the last two decades. The first-in-class Hsp90 inhibitor, 17-AAG (17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin), entered the first clinical trials in 1999. The promising results with this inhibitor stimulated the development of second-generation Hsp90 inhibitors such as alvespimycin (KOS-1022, 17-DMAG) with improved pharmacokinetics. Hsp90 inhibitors were initially evaluated for the treatment of several solid tumours, such as breast, prostate and lung cancers, but have more recently also been tested in haematological malignancies, such as chronic myeloid leukaemia and multiple myeloma. Moreover, recent trials have also evaluated the effects of combination therapies of Hsp90 inhibitors with either other targeted therapies or conventional chemotherapy or radiotherapy.⁴¹ Currently, 13 different Hsp90 inhibitors from several pharmaceutical companies in various oncological indications are ongoing (<http://www.clinicaltrials.gov>).^{42–43} Together, these data indicate that an application in patients with fibrotic diseases might not be limited by toxicity.

In summary, we demonstrate that Hsp90 amplifies the profibrotic effects of TGF- β and that pharmacological inhibition of Hsp90 potentially inhibits fibrosis in preclinical models of different stages of SSc in pharmacologically relevant doses without obvious toxicity. These findings might have direct translational implications. Hsp90 is currently considered a prime candidate for the treatment of various cancers, and its good drugability and encouraging results from clinical trials have stimulated multiple companies to develop Hsp90 inhibitors. Selective and potent inhibitors from about a dozen companies are currently in clinical trial and would be available for clinical trials in SSc and other fibrosing diseases.

Acknowledgements We thank Madeleine Demleitner, Maria Halter and Verena Wäsch for excellent technical assistance.

Contributors Design of the study: MT, JHD. Acquisition of data: MT, PZ, JP, KPZ, JA. Interpretation of data: MT, PZ, JP, KPZ, JA, OD, RB, LS, GS, JHD. Manuscript preparation: MT, PZ, OD, RB, LS, GS, JHD.

Funding Grants DI 1537/4-1, DI 1537/5-1, AK 144/1-1 and SCHE 1583/7-1 from the Deutsche Forschungsgesellschaft, grant A40 from the IZKF in Erlangen, the ELAN-Program of the University of Erlangen-Nuremberg and the Career Support Award of Medicine from the Ernst Jung Foundation, Ministry of Health, Czech Republic (Research Project No 00023728) and SVV: 262512.

Competing interests None.

Ethics approval Ethics committee of the University of Erlangen-Nuremberg.

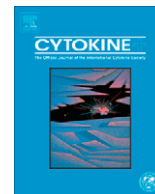
Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Gabrielli A, Awedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009;360:1989–2003.
- Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117:557–67.
- Mori Y, Chen SJ, Varga J. Expression and regulation of intracellular SMAD signaling in scleroderma skin fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003;48:1964–78.
- Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:12319–24.
- Sonnlyal S, Denton CP, Zheng B, et al. Postnatal induction of transforming growth factor beta signaling in fibroblasts of mice recapitulates clinical, histologic, and biochemical features of scleroderma. *Arthritis Rheum* 2007;56:334–44.
- Charles C, Clements P, Furst DE. Systemic sclerosis: hypothesis-driven treatment strategies. *Lancet* 2006;367:1683–91.
- Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381:571–9.
- Buchner J. Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *FASEB J* 1996;10:10–19.
- Zügel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:19–39.
- De Nagel DC, Pierce SK. Heat shock proteins implicated in antigen processing and presentation. *Semin Immunol* 1991;3:65–71.
- Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2:185–94.
- Nardai G, Végli EM, Prohászka Z, et al. Chaperone-related immune dysfunction: an emergent property of distorted chaperone networks. *Trends Immunol* 2006;27:74–9.
- Wrighton KH, Lin X, Feng XH. Critical regulation of TGF β signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:9244–9.
- Koga F, Xu W, Karpova TS, et al. Hsp90 inhibition transiently activates Src kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:11318–22.
- Skhirtladze C, Distler O, Dees C, et al. Src kinases in systemic sclerosis: central roles in fibroblast activation and in skin fibrosis. *Arthritis Rheum* 2008;58:1475–84.
- Beyer C, Distler JH. Tyrosine kinase signaling in fibrotic disorders: translation of basic research to human disease. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:897–904.
- Soga S, Akinaga S, Shiotsu Y. Hsp90 inhibitors as anti-cancer agents, from basic discoveries to clinical development. *Curr Pharm Des* 2013;19:366–76.
- Nahleh Z, Tfayli A, Najm A, et al. Heat shock proteins in cancer: targeting the 'chaperones'. *Future Med Chem* 2012;4:927–35.
- LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988;15:202–5.
- Dees C, Akhmetshina A, Zerr P, et al. Platelet-derived serotonin links vascular disease and tissue fibrosis. *J Exp Med* 2011;208:961–72.
- Distler JH, Jüngel A, Huber LC, et al. Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis Rheum* 2007;56:311–22.
- Lin NY, Beyer C, Gießl A, et al. Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:761–8.
- Schaffner W, Weissmann C. A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 1973;56:502–14.
- Krämer M, Dees C, Huang J, et al. Inhibition of H3K27 histone trimethylation activates fibroblasts and induces fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:614–20.
- Palumbo K, Zerr P, Tomcik M, et al. The transcription factor JunD mediates transforming growth factor [beta]-induced fibroblast activation and fibrosis in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1320–6.
- Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun* 2012;3:735.
- Avouac J, Palumbo K, Tomcik M, et al. Inhibition of activator protein 1 signaling abrogates transforming growth factor β -mediated activation of fibroblasts and prevents experimental fibrosis. *Arthritis Rheum* 2012;64:1642–52.
- Dees C, Zerr P, Tomcik M, et al. Inhibition of Notch signaling prevents experimental fibrosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum* 2011;63:1396–404.
- Beyer C, Schramm A, Akhmetshina A, et al. β -catenin is a central mediator of pro-fibrotic Wnt signaling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:761–7.

Basic and translational research

- 30 Beyer C, Reich N, Schindler SC, *et al.* Stimulation of soluble guanylate cyclase reduces experimental dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:1019–26.
- 31 Zerr P, Palumbo-Zerr K, Distler A, *et al.* Inhibition of hedgehog signaling for the treatment of murine sclerodermatous chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2012;120:2909–17.
- 32 Akhmetshina A, Dees C, Pilecky M, *et al.* Dual inhibition of c-abl and PDGF receptor signaling by dasatinib and nilotinib for the treatment of dermal fibrosis. *FASEB J* 2008;22:2214–22.
- 33 Beyer C, Schett G, Distler O, *et al.* Animal models of systemic sclerosis: prospects and limitations. *Arthritis Rheum* 2010;62:2831–44.
- 34 Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, *et al.* Treatment with imatinib prevents fibrosis in different preclinical models of systemic sclerosis and induces regression of established fibrosis. *Arthritis Rheum* 2009;60:219–24.
- 35 Haupt A, Joberty G, Bantscheff M, *et al.* Hsp90 inhibition differentially destabilises MAP kinase and TGF-beta signalling components in cancer cells revealed by kinase-targeted chemoproteomics. *BMC Cancer* 2012;12:38.
- 36 Weigert O, Lane AA, Bird L, *et al.* Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. *J Exp Med* 2012;209:259–73.
- 37 Reich N, Tomcik M, Zerr P, *et al.* Jun N-terminal kinase as a potential molecular target for prevention and treatment of dermal fibrosis. *Ann Rheum Dis* 2012;71:737–45.
- 38 Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, *et al.* Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999;112:456–62.
- 39 Green MC, Sweet HO, Bunker LE. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 1976;82:493–512.
- 40 Saito E, Fujimoto M, Hasegawa M, *et al.* CD19-dependent B lymphocyte signaling thresholds influence skin fibrosis and autoimmunity in the tight-skin mouse. *J Clin Invest* 2002;109:1453–62.
- 41 Allegra A, Sant'antonio E, Penna G, *et al.* Novel therapeutic strategies in multiple myeloma: role of the heat shock protein inhibitors. *Eur J Haematol*. 2011;86:93–110.
- 42 Sidera K, Patsavoudi E. HSP90 Inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2013. [Epub ahead of print]
- 43 Kim YS, Alarcon SV, Lee S, *et al.* Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. *Curr Top Med Chem* 2009;9:1479–92.



Short Communication

Adiponectin relation to skin changes and dyslipidemia in systemic sclerosis

Michal Tomčík^{a,*}, Kazuhiko Arima^b, Hana Hulejová^a, Markéta Kuklová^a, Mária Filková^a, Martin Braun^a, Jaromír Beláček^c, Marek Novák^c, Radim Bečvář^a, Jiří Vencovský^a, Martin Haluzík^d, Steffen Gay^e, Ulf Müller-Ladner^f, Oliver Distler^e, Ladislav Šenolt^{a,*}

^a Institute of Rheumatology, Department of Clinical and Experimental Rheumatology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

^b Unit of Translational Medicine, Department of Immunology and Rheumatology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Japan

^c Institute of Biophysics and Informatics of the First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

^d 3rd Medical Department – Clinical Department of Endocrinology and Metabolism of the First Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

^e Center of Experimental Rheumatology, University Hospital Zurich, Switzerland

^f University Hospital Giessen, Department of Internal Medicine and Rheumatology, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 October 2011

Received in revised form 10 January 2012

Accepted 3 February 2012

Available online 27 February 2012

Keywords:

Adiponectin

Systemic sclerosis

Fibrosis

Skin score

Dyslipidemia

ABSTRACT

Objectives: Adiponectin was initially described as a regulator of metabolic homeostases. Further studies demonstrated its involvement in the regulation of inflammatory diseases, particularly rheumatic and vascular diseases and some fibrotic processes. The aim of this study was to evaluate adiponectin in the circulation of patients with systemic sclerosis (SSc) and characterise its potential association with skin changes and SSc-related features.

Methods: Serum levels of adiponectin, interleukin-6 and soluble receptor for interleukin-2 (by ELISA), lipid levels, CRP (by turbidimetry), ANA (by immunofluorescence), autoantibodies of the ENA complex (by immunoblot) and urine levels of pyridinoline and deoxypyridinoline (by HPLC) were measured in 39 patients with SSc, and adiponectin levels were determined in 30 healthy controls matched by age, sex, and body mass index (BMI). Organ manifestations were recorded and skin changes were assessed using the modified Rodnan skin score.

Results: Adiponectin serum levels were similar between patients with SSc and healthy controls (median (IQR), 6.9 (5.9–9.1) vs. 7.8 (6.2–9.5) µg/ml, $p = 0.670$). Levels of serum (ln) adiponectin were negatively correlated with the skin score ($r = -0.379$, $p = 0.017$). Regression analysis of the relationship between adiponectin and markers of interest provided two statistically significant models: A- with explanatory variables HDL-cholesterol, skin score, disease duration, age ($R^2 = 0.580$); and B- with CRP, skin score, age ($R^2 = 0.550$); in order of a decreasing influence.

Conclusion: Based on the results of this study, it might be speculated that adiponectin plays a protective role in skin- and atherosclerosis-related changes during SSc.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Systemic sclerosis (SSc) is a severe, chronic connective tissue disorder of uncertain aetiology that affects the skin and visceral organs, particularly the lungs, heart, kidneys and gastrointestinal tract. The early stage of the disease is characterised by endothelial cell injury, perivascular infiltration by inflammatory cells and a reduction in capillary density, as well as a highly irregular architecture of the capillary network. These processes result in decreased capillary blood flow and severe tissue hypoxia and can eventually manifest clinically as skin ulcers [1]. An excessive accumulation of

extracellular matrix (ECM) components, produced by activated fibroblasts with differentiation toward a myofibroblastic phenotype, is the hallmark of the late stages of SSc leading to tissue fibrosis [2]. Profibrotic cytokines such as transforming growth factor (TGF)- β , platelet derived growth factor (PDGF), connective tissue growth factor (CTGF), and endothelin (ET) are believed to play key roles in the excessive synthesis of ECM, which replaces the normal tissue architecture and may culminate in organ failure [2].

Adiponectin is a well-known member of the adipokine family, a variety of peptides produced mainly by adipocytes/macrophages that have been extensively studied in recent years. Some adipokines were initially described as metabolic regulators, such as leptin or adiponectin, while others are well-known cytokines, including interleukin (IL)-1, IL-6, and tumour necrosis factor (TNF)- α [3,4]. Adiponectin structurally belongs to the collagen superfamily and shares homologies with collagens, complement

* Corresponding authors. Address: Institute of Rheumatology, Na Slupi 4, 12850 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 234075232; fax: +420 224914451.

E-mail addresses: michaltomcik@yahoo.com (M. Tomčík), seno@revma.cz (L. Šenolt).

factors and TNF- α . Protective attributes of adiponectin have been reported that include a variety of anti-inflammatory activities ranging from the inhibition of pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules to the induction of anti-inflammatory factors [3,4]. Decreased circulating levels of adiponectin in obesity, type 2 diabetes and cardiovascular diseases are believed to increase insulin resistance, subclinical inflammation and the risk of cardiovascular morbidity [5].

On the other hand, increased local and/or systemic adiponectin levels are found in chronic inflammatory and autoimmune diseases such as rheumatoid arthritis (RA) or systemic lupus erythematosus (SLE) [6,7]. Moreover, adiponectin has been proposed to modulate inflammatory processes responsible for the activation of inflammation and the immune response. In contrast, there are reports showing an anti-inflammatory role of adiponectin in the pathophysiology of RA [8]. Recently, adiponectin has also been shown to exhibit certain anti-fibrotic properties. In liver fibrosis, adiponectin may reverse the activation of hepatic stellate cells, which play a key role in the pathogenesis of hepatic fibrosis and maintain their quiescence [9]. In angiotensin II-induced cardiac fibrosis, adiponectin exhibits protective effects through inhibition of the formation of reactive oxygen species and pro-fibrotic TGF- β signalling [10]. Therefore, we hypothesised in the present work that the levels of serum adiponectin might be different between patients with SSc and healthy individuals and could be associated with fibrotic skin changes and/or other SSc-related features.

2. Material and methods

2.1. Patients and controls

A total of 39 Caucasian patients (36 females; mean age of 51.3 years and disease duration of 5.4 years) who met the American College of Rheumatology classification criteria for SSc [11] and 30 healthy individuals (29 females; mean age of 52.2 years) matched by age and body mass index (BMI) were included in this study. None of the individuals had a history of diabetes mellitus; however, the data were not available for four patients with SSc. Clinical and demographic characteristics of the patients and healthy individuals are shown in Table 1. SSc-related manifestations were obtained from the Czech and Swiss Registry Database of patients with SSc. Interstitial lung disease, pulmonary arterial hypertension, oesophageal dysmotility, cardiac and renal involvement, nailfold capillaroscopy and Raynaud's phenomenon were recorded. Assessments and definitions of these organ manifestations

are detailed in Becvar et al. [12]. Skin changes of patients with SSc were assessed using the modified Rodnan skin score [13], evaluating 17 skin sites via an established scoring system from 0 (uninvolved) to 3 (severe thickening) with a maximum total score of 51. The study was approved by the local ethics committee, and each patient signed an informed consent form.

2.2. Laboratory analysis

Serum levels of adiponectin were measured in both groups using a high-sensitivity ELISA kit (Biovendor, Brno, Czech Republic) in a blinded manner. The assay recognises natural and recombinant (full length, mutation-modified trimer-only-forming, and globular domain) human adiponectin, and its limit of detection (LOD) for serum samples is 0.47 ng/ml. Serum levels of selected potential disease activity markers, IL-6 and soluble receptor for interleukin-2 (sIL-2r) [12], were measured using an ELISA kit (BioSource International, Inc., California, USA). The assay sensitivity for IL-6 is <2 pg/ml, and for sIL-2r <16 pg/ml. Urine samples were analysed for pyridinoline (U-PD) and deoxypyridinoline (U-DPD) using high-performance liquid chromatography (Shimadzu Class VP, 5.0, Kyoto, Japan) based on ion-exchange chromatographic separation of urine hydrolysates with a sensitivity limit of 200 fmol for both cross-links [12]. In patients, serum lipid concentrations were measured after overnight fasting using standard methods, and the atherogenic index (AI) was calculated ($\log(\text{triglycerides}/\text{HDL-cholesterol})$) [14]. Antinuclear antibodies (ANAs) were detected using indirect immunofluorescence on HEP2 cells, and the autoantibodies of the ENA complex (anti-U1RNP, anti-NRNP, anti-Ro, anti-La, anti-DNA-topoisomerase I, anti-Jo-1, anti-P protein, anti-Sm, anti-centromere) were assayed by immunoblot. C-reactive protein (CRP) concentration was assessed using turbidimetry, and erythrocyte sedimentation rate (ESR) was measured according to Fahraeus and Westergren.

2.3. Statistics

Data were analysed using SPSS 17.0 software. The normal distribution of measured variables was assessed using One-Sample Kolmogorov–Smirnov Test and normality tests based on Skewness and Kurtosis. Adiponectin values in patients with SSc and healthy controls were not normally distributed; therefore, nonparametric Mann–Whitney test was used for their comparison. To adhere to normal distribution assumptions, a natural logarithmic transformation (ln) was used for non-normally distributed variables,

Table 1
Clinical and demographic characteristics of patients with systemic sclerosis and healthy controls.

Characteristics	SSc (n = 39)	Controls (n = 30)	p
Age, mean \pm SD (range) years	51.3 \pm 12.6 (23–77)	52.2 \pm 10.5 (32–74)	NS
Sex (F/M)	36/3	29/1	NS
BMI, mean \pm SD (range) kg/m ²	24.4 \pm 4.4 (16.0–33.2)	24.4 \pm 4.6 (18.5–31.4)	NS
Diabetes mellitus	0*	0	NS
Disease duration, mean \pm SD (range) years	5.4 \pm 3.2 (1–15)	NA	NA
SSc subset lcSSc/dcSSc	27/12	NA	NA
SSc-related manifestations (%) ILD/PAH/OD/CI/RI/PCP/RP	54/10/77/13/16/87/100	NA	NA
Drugs (%) GC/CPA/DP	56/23/28	NA	NA
Autoantibodies (% positive) ANA/Scl-70/ACA	97/49/15	–	NA
MRSS, mean \pm SD (range)	7.4 \pm 5.8 (0–25)	–	NA
CRP, mean \pm SD (range) mg/l	5.7 \pm 6.8 (0.3–25.0)	–	NA
ESR, mean \pm SD (range) mm/h	19.8 \pm 12.1 (2–52)	–	NA

SSc, systemic sclerosis; SD, standard deviation; NS, not significant; NA, not applicable; –, not examined; F, female; M, male; BMI, body mass index; lcSSc, limited cutaneous systemic sclerosis; dcSSc, diffuse cutaneous systemic sclerosis; ILD, interstitial lung disease; PAH, pulmonary arterial hypertension; OD, oesophageal dysmotility; CI, cardiac involvement; RI, renal involvement; PCP, pathological capillaroscopic pattern; RP, Raynaud's phenomenon; GC, low dose glucocorticoids; CPA, cyclophosphamide; DP, D-penicillamine; ANA, antinuclear antibody; Scl-70, anti-DNA-topoisomerase I; ACA, anticentromere antibody; MRSS, modified Rodnan skin score; CRP, C-reactive protein; ESR, erythrocyte sedimentation rate.

* The data were not available for 4 patients.

provided availability in term of normality. Pearson's correlation coefficients were calculated to analyse the relationship between $\ln_{\text{adiponectin}}$ and other measured markers (at level of statistical significance $p < 0.05$). For multiple testing analysis, the Bonferonni correction was performed ($p < 0.05/12 = 0.0042$). Regression analysis was used to test the relationship between adiponectin and a group of selected markers of interest. Subsequent analysis of the obtained regression models confirmed normal distribution of regression residuals. Data are expressed as median (interquartile range).

3. Results

Adiponectin serum levels were similar between patients with SSc and healthy controls (6.9 (5.9–9.1) vs. 7.8 (6.2–9.5) $\mu\text{g/ml}$, $p = 0.670$). Interestingly, levels of $\ln_{\text{adiponectin}}$ were negatively correlated with the modified Rodnan skin score ($r = -0.379$, $p = 0.017$) (Fig. 1). In addition, levels of serum HDL-cholesterol were negatively correlated with disease duration ($r = -0.50$, $p = 0.005$). Out of 39 patients with SSc, 40% were at high risk (AI values >0.24), 24% at moderate risk (AI values of 0.1–0.24), and 36% at low risk (AI values of -0.3 –0.1) of cardiovascular diseases according to the atherogenic index. Levels of $\ln_{\text{adiponectin}}$ were not associated with BMI in patients with SSc ($r = 0.14$, $p = 0.38$) or healthy individuals ($r = 0.21$, $p = 0.20$). Furthermore, levels of $\ln_{\text{adiponectin}}$ were not correlated with other parameters, such as \ln_{CRP} ($r = -0.27$, $p = 0.15$), ESR ($r = -0.07$, $p = 0.68$), $\ln_{\text{IL-6}}$ ($r = -0.32$, $p = 0.09$), $\ln_{\text{IL-2r}}$ ($r = -0.23$, $p = 0.22$), total cholesterol ($r = 0.26$, $p = 0.16$), HDL-cholesterol ($r = 0.30$, $p = 0.11$), LDL-cholesterol ($r = 0.13$, $p = 0.51$), triglycerides ($r = 0.27$, $p = 0.15$), or urinary levels of collagen metabolites U-PD ($r = 0.01$, $p = 0.98$) and U-DPD ($r = 0.07$, $p = 0.72$) (Spearman's rank correlation was computed only for non-normally distributed U-PD and U-DPD). The presence of autoantibodies (ANA, anti-centromere, anti-DNA-topoisomerase I), a pathological capillaroscopic pattern, the administration of low dose glucocorticoids (or immunosuppressive treatment) and the exhibition of the main clinical symptoms of SSc did not affect levels of serum adiponectin (data not shown).

However, neither relation between $\ln_{\text{adiponectin}}$ and the modified Rodnan skin score, nor relation between HDL-cholesterol and disease duration was approved at corrected level of statistical significance after strict Bonferonni's correction ($p = 0.017 > 0.0042$; $p = 0.005 > 0.0042$, respectively). Regression analysis of $\ln_{\text{adiponectin}}$ and measured markers of interest provided two statistically significant models: regression model A, describing the relationship between adiponectin and the group of explanatory variables – HDL-cholesterol, skin score, disease duration, and age – ordered according to a decreasing influence ($R^2 = 0.580$); and regression

model B, describing association between adiponectin and the group of explanatory parameters – CRP, skin score, and age – ordered according to a decreasing influence ($R^2 = 0.550$).

4. Discussion

4.1. Discussion

Many studies have consistently reported lower levels of serum adiponectin in patients with obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular diseases, whereas several reports demonstrated elevated levels of adiponectin in patients with chronic inflammatory and autoimmune diseases, such as RA or SLE [6,7]. Some studies suggested that elevated serum adiponectin levels were related to inflammatory status and increased radiographic damage, while others discussed that adiponectin played an anti-inflammatory role in the pathophysiology of RA [6]. In the present study, we found that levels of serum adiponectin in SSc patients did not differ from those in healthy subjects. We propose that this might be due to the fact that systemic inflammatory activity is not as high in SSc as in RA. Furthermore, the findings of the present study reveal that levels of serum adiponectin are positively associated with levels of serum HDL-cholesterol, which is in agreement with previous results in subjects with metabolic diseases [5]. In a nondiabetic population, low adiponectin levels are associated with low HDL cholesterol, elevated triglycerides, and small dense LDL cholesterol, increased plaque volume, lipid-rich plaque and intimal thickening of coronary arteries, suggesting an antiatherogenic role in the early stages of lesion development [5]. Therefore, it can be speculated that adiponectin might play a protective role in atherosclerosis-related changes during SSc, as there is preliminary evidence that the prevalence of subclinical coronary atherosclerosis could be higher in patients with SSc compared to healthy controls [15]. In addition, we observed that serum levels of HDL cholesterol were negatively associated with disease duration, which is in agreement with recent data showing that patients with SSc exhibited an atherogenic lipid profile with rather low serum levels of HDL cholesterol [16]. It can be suggested that with the disease progression of SSc, subclinical atherosclerosis and an increased risk for cardiovascular events may occur.

Interestingly, lower adiponectin serum levels were associated with an advanced stage of skin fibrosis. Therefore, it can be hypothesised that adiponectin plays a protective role in the fibrotic process of the skin and possibly other involved organs in SSc. This finding is supported by data providing evidence that adiponectin is an anti-fibrotic mediator [9,10]. The mechanism(s) of adiponectin-exerting protective effect(s) in fibrosis has not yet been elucidated. However, based on the studies of liver and cardiac fibrosis [9,10], it can be speculated that a lack of adiponectin may contribute to the activation of dermal fibroblasts, leading to the increased synthesis and deposition of ECM components in the skin of SSc patients. Altogether, these data propose that adiponectin might exhibit anti-fibrotic, and anti-atherogenic properties in SSc.

4.2. Conclusions

We demonstrate here for the first time that levels of serum adiponectin are negatively associated with skin thickness in patients with SSc. Furthermore, we show that levels of serum CRP and HDL-cholesterol, along with skin thickness, disease duration and age, play a significant role in the explanation of variability of adiponectin serum levels. However, possibly due to a small number of patients, the relation between adiponectin and skin thickness was not approved at corrected level of statistical significance after Bonferonni correction for multiple testing.

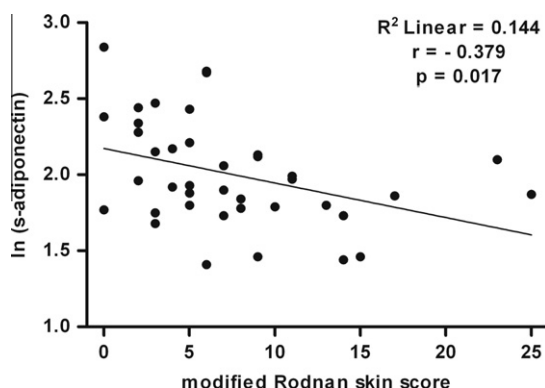


Fig. 1. Negative correlation between the levels of serum adiponectin (\ln) and the modified Rodnan skin score.

Conflict of Interest

No Conflict of Interest has been declared by the author(s).

Acknowledgements

This work was supported by Ministry of Health Czech Republic [Research Project No. 00023728] And SVV: 262512.

References

- [1] Distler JH, Gay S, Distler O. Angiogenesis and vasculogenesis in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45(Suppl. 3):iii26–7.
- [2] Abraham DJ, Krieg T, Distler O, Distler J. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48(Suppl. 3):iii3–7.
- [3] Lago F, Dieguez C, Gómez-Reino J, Gualillo O. Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007;3:716–24.
- [4] Haluzik M, Parizkova J, Haluzik MM. Adiponectin and its role in the obesity-induced insulin resistance and related complications. *Physiol Res* 2004;53:123–9.
- [5] Marso SP, Mehta SK, Frutkin A, House JA, McCrary JR, Kulkarni KR. Low adiponectin levels are associated with atherogenic dyslipidemia and lipid-rich plaque in nondiabetic coronary arteries. *Diabetes Care* 2008;31:989–94.
- [6] Šenolt L, Pavelka K, Housa D, Haluzik M. Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 2006;35:247–52.
- [7] Sada KE, Yamasaki Y, Maruyama M. Altered levels of adipocytokines in association with insulin resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2006;33:1545–52.
- [8] Ehling A, Schäffler A, Herfarth H, Herfarth H, Tarner I, Schölmerich J, et al. The potential of adiponectin in driving arthritis. *J Immunol* 2006;176:4468–78.
- [9] Ding X, Saxena NK, Lin S, Xu A, Srinivasan S, Anania FA. The roles of leptin and adiponectin: a novel paradigm in adipocytokine regulation of liver fibrosis and stellate cell biology. *Am J Pathol* 2005;166:1655–69.
- [10] Fujita K, Maeda N, Sonoda M. Adiponectin protects against angiotensin II-induced cardiac fibrosis through activation of PPAR- α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:863–70.
- [11] Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and Therapeutics Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980;23:581–90.
- [12] Becvár R, Stork J, Pesáková V, Stánová A, Hulejová H, Rysová L, et al. Clinical correlations of potential activity markers in systemic sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1051:404–12.
- [13] Clements PJ, Lachenbruch PA, Seibold JR, Zee B, Steen VD, Brennan P, et al. Skin thickness score in systemic sclerosis: an assessment of interobserver variability in 3 independent studies. *J Rheumatol* 1993;20:1892–6.
- [14] Dobíášová M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin Biochem* 2001;34(7):583–8.
- [15] Khurma V, Meyer C, Park GS, McMahon M, Lin J, Singh RR, et al. A pilot study of subclinical coronary atherosclerosis in systemic sclerosis: coronary artery calcification in cases and controls. *Arthritis Rheum* 2008;59:591–7.
- [16] Tsifetaki N, Georgiadis AN, Alamanos Y, Fanis S, Argyropoulou MI, Drosos AA. Subclinical atherosclerosis in scleroderma patients. *Scand J Rheumatol* 2010;39:326–9.